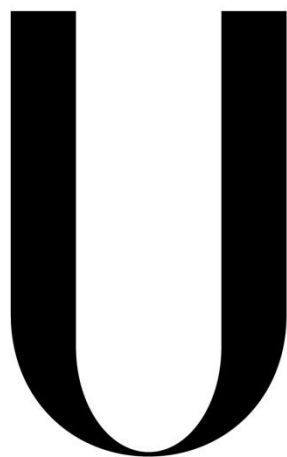


Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
Departamento de Biologia Animal



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

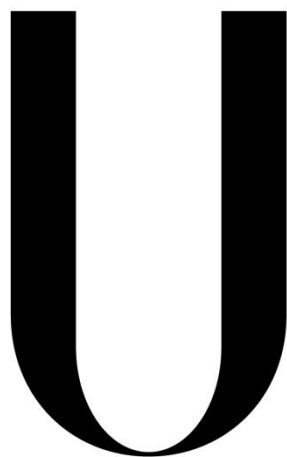
SIMULAÇÃO *in vitro* DO PROCESSO DIGESTIVO DE
PATULINA EM SUMOS DE FRUTA

Mariana Marques da Costa Ferreira

Dissertação
Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2014

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
Departamento de Biologia Animal



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

SIMULAÇÃO *in vitro* DO PROCESSO DIGESTIVO DE
PATULINA EM SUMOS DE FRUTA

Mariana Marques da Costa Ferreira

Dissertação

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2014

Orientador(a) interna: Professora Doutora Maria Teresa Rebelo, mtrebelo@fc.ul.pt

Orientador(a) externa: Doutora Paula Cristina Alvito, Paula.Alvito@insa.min-saude.pt

I - Agradecimentos

- ◆ Doutora Maria Antónia Calhau, Coordenadora do Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN), do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge IP (INSA), por ter autorizado a elaboração deste trabalho.
- ◆ Doutora Paula Alvito, orientadora externa, por ter aceitado ser minha orientadora neste trabalho, por todo o tempo e ajuda dispensada para a realização e revisão do mesmo.
- ◆ Professora Doutora Maria Teresa Rebelo, orientadora interna, por ter aceitado ser minha orientadora, estando sempre disponível para o esclarecimento de quaisquer eventuais dúvidas e acompanhamento do meu trabalho assim como a sua revisão.
- ◆ À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT, Lisboa), por ter apoiado o desenvolvimento deste estudo que foi realizado no âmbito do Projecto Mycomix – Estudo exploratório dos efeitos tóxicos de misturas de micotoxinas em alimentos para crianças e potencial impacto na saúde (PTDC/DTP-FTO/0417/2012).
- ◆ Carla Martins, por todo o tempo dispensado para me acompanhar no laboratório desde o início ao fim de um procedimento, bem como explicações sobre o funcionamento do HPLC e SPE e processamento dos resultados deste trabalho.
- ◆ Ana Tavares, por me ter acompanhado no trabalho no laboratório, partilhando material e informações importantes para o desenvolvimento dos estudos que vim a desenvolver neste trabalho, nos domínios da digestão e também no acompanhamento das células Caco-2, além da companhia durante as horas de almoço, partilha do computador durante os primeiros meses de trabalho.
- ◆ Ricardo Assunção, por me ter acompanhado ao longo deste trabalho, dando uma preciosa ajuda no tratamento estatístico dos resultados, nos estudos da digestão, tratamento das “nossas meninas”, as células Caco-2 e, claro, pela boa companhia durante a minha estadia no instituto.
- ◆ Susana Santiago, Ana Cláudia e Fernanda pela boa disposição e simpatia com que me receberam neste departamento, muito obrigada!
- ◆ À equipa da Decathlon de Loures, que com a boa disposição contagiosa, tornou o trabalho dentro e fora da loja mais motivador e alegre: Pedro Mariano, Ana e

Pedro Cachada, Marta Pereira e Tiago Castro, mais do que colegas de trabalho, grandes amigos. Vítor Santos, João Ferreira, Hugo Cerqueira, Bruno Pereira, Inês Simões, Catarina Ramos, Catarina Ladeiro, Cláudia Vitorino, Diogo Santos, Ricardo Conceição e toda a equipa de loja, pessoas que, de uma forma ou de outra, me deram o seu contributo e que nunca vou esquecer! Carina Pimenta, chefe dedicada da grande equipa da montanha que acreditou em mim desde o início e me facilitou os horários do trabalho na loja para que a elaboração deste trabalho fosse possível.

- ◆ Débora Luz, amiga sempre disponível para tudo! Sempre presente nos bons e maus momentos. Os nossos momentos são sempre memoráveis! As festas que fazemos sozinhas, apesar de serem só disparates, são espetaculares! Eternamente adolescentes e felizes.
- ◆ Natália Siroruca, Tânia Gonçalves e Maria Sebastião, as minhas três grandes amigas. Podemos apenas ver-nos uma vez de 6 em 6 meses mas parece que o tempo não passa pois continuamos iguais!
- ◆ Filipe Lopes a magia da nossa amizade é inexplicável.
- ◆ Pedro Ferreira, é o meu irmão e basta!
- ◆ E claro, por fim, aos meus pais José e Emília, e aos meus avós Evaristo e Amélia, por me terem apoiado durante todo este tempo, por me terem ajudado sempre que necessitei e mais importante, por nunca me terem deixado desistir de continuar a estudar e trabalhar para ser cada vez mais uma pessoa e profissional melhor!

Obrigado a todos os que fizeram parte deste percurso da minha vida!

II – Sumário

Os géneros alimentícios podem apresentar contaminantes de diversas origens e com diferentes toxicidades, podendo representar um perigo para a saúde humana. As micotoxinas são metabolitos produzidos por fungos capazes de induzir efeitos carcinogénicos e imunossupressores, podendo constituir um problema grave para a saúde pública. A patulina, uma micotoxina presente essencialmente em frutos como maçã e seus produtos derivados, apresenta capacidade genotóxica, mutagénica, imunossupressora e neurotóxica e é particularmente relevante no que respeita à saúde infantil, uma vez que as crianças tendem a consumir uma grande quantidade de produtos à base de fruta durante o seu crescimento.

Este trabalho tem por objetivo simular o processo digestivo de patulina em sumos de fruta bem como compreender qual a influência da matriz alimentar (refeição sólida) e do modelo de digestão *in vitro* utilizado (adulto ou infantil) na bioacessibilidade (percentagem de contaminante que se liberta da matriz por ação dos sucos digestivos e que fica disponível para ser absorvida) de sumos contaminados artificialmente com patulina. A identificação e quantificação de patulina presente nos alimentos foram realizadas através da análise por SPE-HPLC-UV.

No domínio da bioacessibilidade em sumos foram efetuados ensaios de estabilidade de patulina, estudados os possíveis efeitos do método de extração utilizado em sumos antes e após a digestão e ainda a variabilidade das amostras nos ensaios de bioacessibilidade. A patulina manteve-se estável em amostras contaminadas conservadas a uma temperatura de -20°C durante 3 meses. O método de extração (SPE), foi o que permitiu obter valores mais elevados de recuperação (entre 58 e 84%) e não se verificaram diferenças significativas nos valores de bioacessibilidade de sumos obtidos no dia e em diferentes dias de análise de patulina (p valor=0,584).

Os estudos de bioacessibilidade em sumos na presença de refeição sólida (simulando a ingestão de sólidos e líquidos numa refeição) revelaram que na presença de esparguete à bolonhesa, guisado de borrego e bolacha maria, os valores de bioacessibilidade diminuem para todas as amostras (de 29,72 para 7,64%; 23,29 para 16,45% e 21,46 para 6,50%, respetivamente). A comparação dos valores de bioacessibilidade na presença e ausência de refeição permitiram determinar a existência

de diferenças estatisticamente significativas para a maioria das amostras de sumo analisadas. Permitindo concluir que a inclusão de uma refeição padrão tem interferência nos valores de bioacessibilidade de patulina em amostras de sumo contaminadas artificialmente, provocando a sua redução.

A comparação dos resultados para a bioacessibilidade de patulina em sumos utilizando dois modelos de digestão *in vitro* diferentes, um destinado a simular o processo digestivo adulto, e outro infantil, revelaram valores médios de bioacessibilidade de $18,96\% \pm 6,70$ com o modelo de adulto e $7,1\% \pm 3,50$, para o modelo infantil verificando-se uma diferença estatisticamente significativa para estes resultados (p valor=0,00). Estes estudos revelaram que, no modelo para crianças, 7,1% de patulina atinge o intestino sem sofrer alterações, o que do ponto de vista toxicológico significa que esta quantidade estará disponível para ser absorvida e exercer os seus efeitos tóxicos no organismo. Este resultado é particularmente importante dado que se trata de um modelo para crianças, cuja vulnerabilidade a doenças é superior à dos adultos.

Será importante efetuar mais ensaios com vista a confirmar os resultados encontrados face à sua importância na saúde infantil. Existe muito pouca bibliografia sobre a bioacessibilidade de patulina em alimentos, e esta é escassa para os modelos que simulem a digestão em crianças pelo que este trabalho se apresenta como inovador pretendendo ser um contributo para os estudos na área da segurança alimentar.

Palavras-chave: Patulina, bioacessibilidade, digestão *in vitro*, SPE-HPLC, crianças

III - Abstract

Human food could be contaminated with toxins from diverse origins. Mycotoxins, metabolites produced by fungi, may constitute a serious problem to human health, since they can promote carcinogenic and immunosuppressants effects. Patulin, a mycotoxin present in apple and apple fruit derivatives with genotoxic, mutagenic, immunosuppressants and nephrotoxic effects, is a mycotoxin that has children as a special target due to their high consumption of apple based foods.

The present study aims to simulate the *in vitro* digestion of patulin in fruit juices and the influence of food matrix (solid meals) and the *in vitro* digestion model (adult and infant) in the bioaccessibility of artificially contaminated fruit juices. The identification and quantification of patulin in infant foods will be carried out through the analysis by SPE-HPLC-UV.

Patulin bioaccessibility study included the stability of patulin in contaminated fruit juices, the effect of patulin extraction method in digested and non-digested samples, and the inter and intraday variability. Patulin contaminated juices maintain the same toxin concentration at -20°C for a three months period. The solid phase extraction method (SPE) is the one that allowed to obtain the highest patulin recovery values (between 58 and 84%). There was no significance difference for intra and inter days variability (p value= 0.584).

Patulin bioaccessibility in the presence and absence of a solid meal (simulating the liquid and solids ingestion) revealed to be lower when a 'meal with spaghetti', 'stew of lamb' or 'Maria cookies' was added (29.72 to 7.64%; 23.29 to 16.45% and 21.46 to 6.50%, respectively). There were significant differences between the samples with or without solid meal for the majority of assayed fruit juices analyzed. According to this study, the presence of a meal and the type of meal could affect the bioaccessibility of patulin, by interfering with the matrix of the fruit juices leading to a decay of bioaccessibility values.

Patulin bioaccessibility for different *in vitro* digestion methods was also studied. The differences between adult and infant digestion methods revealed to be statistically different, with adult model showing higher bioaccessibility values ($18.96\% \pm 6.70$) than infant method ($7.1\% \pm 3.50$). The fact that there is still 7.1% of patulin in infant

digestive tract to be absorb and to induce its toxicity effect is very important from the toxicological point of view, mainly due to the infants greater physiological vulnerability that adults.

It would be important to perform more studies to confirm the obtained results due to its significance for children health. There is scarce literature concerning patulin bioaccessibility in food, and only few using *in vitro* digestion models adapted to children, which turns this work innovator and a contribution to o food safety studies.

Keywords: Patulin, bioaccessibility, *in vitro* digestion, SPE-HPLC-UV, children

Índice

I - Agradecimentos	2
II – Sumário	4
III - Abstract	6
IV - Índice de Tabelas	10
V - Índice de Figuras	10
VI - Lista de Abreviaturas e Acrónimos.....	11
VII - Importância do tema e organização do trabalho	14
1- Introdução.....	16
1.1- Micotoxinas	16
Organismos produtores, caracterização química e carcinogénica	16
Ocorrência, legislação e efeitos na saúde humana	18
1.1.1- Patulina.....	20
1.2- Determinação analítica de micotoxinas.....	23
Preparação das amostras.....	23
1.2.1- Cromatografia	23
Cromatografia Líquida	24
1.2.2 - Extração em Fase Sólida (SPE) – Purificação Amostras	24
Pectinase.....	25
1.2.3- Cromatografia Líquida de Alta Precisão – HPLC.....	25
1.2.4- Outros métodos analíticos	27
1.3- Digestão Humana	28
Conceitos gerais	28
Fase Oral: Saliva	29
Fase Gástrica: Suco Gástrico, Esvaziamento e pH.....	29
Fase Duodenal: BÍlis, Suco Pancreático, tempo de residência e pH	30
1.3.1- Noção de BioDisponibilidade e Bioacessibilidade	30
1.3.2- Modelos de Digestão <i>in vitro</i>	31
Modelos estáticos	33
Digestão em crianças.....	34
1.4- Objetivos	36
2- Materiais e Métodos	38
2.1- Amostras	38

2.2- Determinação de patulina por SPE- HPLC -UV	41
2.2.1- Reagentes e soluções.....	41
Soluções gerais.....	41
Soluções de extração	41
Fases móveis	41
Soluções de micotoxinas	42
2.2.2- Extração e purificação por SPE	42
Pectinase.....	43
2.2.3- Análise Cromatográfica	43
2.2.4- Preparação e contaminação artificial das amostras	46
2.3 – Bioacessibilidade da patulina	47
2.3.1- Reagentes e soluções.....	47
Soluções gerais.....	47
Preparação dos sucos.....	47
2.3.2 – Digestão <i>in vitro</i>	48
2.3.3- Bioacessibilidade da patulina em sumos.....	49
2.3.4- Análise do efeito da matriz alimentar na bioacessibilidade de patulina	50
2.3.5- Estudo comparativo da digestão com os modelos <i>in vitro</i> de adulto e infantil	50
2.4- Determinação da bioacessibilidade e análise estatística dos resultados.....	51
3- Resultados	52
3.1 – Estudo da bioacessibilidade de patulina em sumos	52
3.1.1 – Estabilidade da patulina a -20°C.....	52
3.1.2 – Recuperação da patulina - extração e digestão <i>in vitro</i>	53
3.1.3- Variabilidade da bioacessibilidade da patulina	54
3.2 – Análise do efeito da matriz alimentar na bioacessibilidade de patulina.....	57
3.2.1 – Bolonhesa.....	57
3.2.2 – Guisado de Borrego.....	58
3.2.3 – Bolacha Maria	60
Diferenças entre amostras e comparação entre refeições	61
3.3- Estudo comparativo da digestão com os modelos <i>in vitro</i> de adulto e infantil.....	64
4- Discussão e Considerações Finais.....	68
5- Referências Bibliográficas	71
6- Anexos.....	78

IV - Índice de Tabelas

Tabela 1 - Micotoxinas, fungos produtores e géneros alimentícios suscetíveis de contaminação	17
Tabela 2 - Classificação dos agentes de acordo com o seu potencial carcinogénico em humanos segundo a IARC	18
Tabela 3 – Identificação das amostras de sumo de frutos usadas no estudo da bioacessibilidade de patulina.	39
Tabela 4 – Identificação das refeições sólidas usadas no estudo da bioacessibilidade da patulina	40
Tabela 5- Condições cromatográficas utilizadas na deteção de patulina.	44
Tabela 6 – Composição, volume final dos sucos digestivos e quantidade de reagentes utilizadas (mg) nos modelos de digestão <i>in vitro</i> em adulto e infantil	48
Tabela 7 – Contaminação média de patulina em sumos contaminados artificialmente, mantidos a -20°C ao longo de três meses (contaminação média expressa em µg/Kg, n=4, ensaios em duplicado).	52
Tabela 8 – Valores médios de recuperação (%) da patulina em amostras de sumo usando a extração com SPE e pectinase e SPE (P+SPE) (n=2, ensaios em duplicado). DP: Desvio Padrão.....	53
Tabela 9 - Valores médios de recuperação (%) da patulina em amostras de sumo antes digestão (AnD) e após digestão (ApD) pelo método de digestão <i>in vitro</i> para adulto (n=2, duplicados). DP: Desvio Padrão.	54
Tabela 10 - Bioacessibilidade da patulina em sumos analisados em dois dias diferentes e análise descritiva dos resultados (n=4). DP: Desvio Padrão.	55
Tabela 11 –Bioacessibilidade de patulina (%) em 6 sumos de fruta na ausência e presença de refeição bolonhesa. DP: Desvio Padrão.....	58
Tabela 12 - Bioacessibilidade para os diferentes sumos na presença de refeição guisado de borrego (n=4). DP: Desvio Padrão.	59
Tabela 13 - Bioacessibilidade para os diferentes sumos na presença de refeição bolacha maria (n=4). DP: Desvio Padrão.	61
Tabela 14 - Bioacessibilidade de patulina em amostras de sumo (8 Frutos, Tropical, Maçã e Maçã-Cenoura) na ausência de refeição com recurso a dois modelos de digestão <i>in vitro</i> , Adulto e Infantil. DP: Desvio Padrão.	65
Tabela 15 - Bioacessibilidade de patulina em amostras de sumo na presença de refeição com recurso a dois modelos de digestão <i>in vitro</i> , Adulto e Infantil. DP: Desvio Padrão.	66

V - Índice de Figuras

Figura 1 - Parâmetros que influenciam o sistema gástrico e duodenal (SGD) em estudos de nutrição e saúde (adaptado de Guerra et al., 2012).....	33
Figura 2- Representação- esquemática das condições experimentais de um modelo de digestão <i>in vitro</i> de três etapas que simula o processo digestivo de um alimento na boca, estômago e intestino delgado (adaptado de Versantvoort, et al., 2005; InfoEscola, 2013).	34

VI - Lista de Abreviaturas e Acrónimos

µg/Kg - micrograma por kilograma

µL – microlitros

AFM₁- Aflatoxina M₁

AFTs - Aflatoxinas

B- Biliar

CAST – Concelho para Ciência e Tecnologia Agrícola (*Council for Agriculture Science and Technology*)

CCF/TLC - Cromatografia em camada fina

CE - Comissão Europeia

DAN - Departamento de Alimentação e Nutrição

D-Duodenal

DP – Desvio Padrão

DON - Desoxinivalenol

EFSA – Agência Europeia De Segurança Alimentar (*European Food Safety Agency*)

ELSD – Detetor evaporativo de espalhamento de luz (*Evaporative light scattering detector*)

FAO – Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (*Food and Agriculture Organization*)

FDA – Agência Americana de Controlo da Qualidade de Produtos Alimentares e Farmacêuticos (*Food and Drug Administration*)

FSA – Agência de Standards dos Alimentos (*Food Standards Agency*)

FUM - Fumonisina

g - Grama

G- Gástrico

GLC - cromatografia gás-líquido

h - Hora

HPLC - Cromatografia Líquida de alta eficiência/pressão (*High performance liquid chromatography*)

HPLC-UV – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detetor UV

IARC –Agência Internacional de Investigação em Cancro (*International Agency for Research on Cancer*)

INSA - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

kcal/min - kilocalorias por minuto

Kg - Kilograma

LC - cromatografia líquida

LLE - extração líquido-líquido

min - minuto

mL - mililitro

NOAEL – Nível onde não se observam efeitos adversos (*No Observed-Adverse-Effect-Level*)

OTA - Ocratoxina A

PAT – Patulina

PMTDI – Dose máxima diária tolerável (*Provisional maximum tolerable daily intake*)

ppt - partes por trilhão

PTDI – Dose diária tolerável (*Provisional Tolerable Daily Intake*)

PTWI -Dose semanal tolerável (*Provisional Tolerable Weekly Intake*)

S – Saliva

SGD - Sistema Gástrico e Duodenal

SPE – Extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction*)

UPLC - Cromatografia de ultra eficiência/pressão (*Ultra performance liquid chromatography*)

UV - ultra-violeta

vs - versus

WHO – Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

ZEN – Zearalenona

VII - Importância do tema e organização do trabalho

Os produtos alimentícios ingeridos pelos humanos estão sujeitos à exposição a diversos contaminantes químicos como resultado de resíduos da produção, transformação, acondicionamento, transporte e conservação dos alimentos. Apesar destes contaminantes não serem intencionalmente colocados, estão presentes nos alimentos e podem influenciar a toxicidade dos mesmos. Os alimentos assim contaminados podem comprometer o estado de saúde de quem os consome (Versantvoort et al., 2005) .

Este trabalho é focado na micotoxina patulina devido à sua relação com os alimentos à base de maçã, em especial sumos que podem ser utilizados para consumo infantil.

Esta dissertação está organizada em quatro capítulos principais: Introdução e Objetivos, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Perspetivas Futuras

A Introdução está dividida em 3 seções: Micotoxinas, sua Determinação analítica e Digestão Humana. Na seção das micotoxinas efetuasse uma abordagem geral sobre os organismos produtores de micotoxinas, caracterização química, carcinogenicidade, ocorrência, efeitos na saúde humana através da alimentação e também a legislação associada, particularizando posteriormente a patulina, micotoxina alvo deste trabalho. Na seção da determinação analítica de micotoxinas são referenciadas as metodologias utilizadas na determinação das micotoxinas em alimentos, nomeadamente a extração em fase sólida (SPE) e a cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Atendendo que o interesse deste trabalho se foca na alimentação humana é referenciada por fim a digestão humana e a aplicação em modelos *in vitro* para o estudo de bioacessibilidade, método base neste trabalho. Os objetivos deste trabalho são apresentados após a introdução num subcapítulo específico.

Os Materiais e Métodos, incluem a caracterização das amostras estudadas, os materiais e métodos utilizados ao longo deste estudo para a determinação da patulina e estudos da sua bioacessibilidade incluindo os modelos de digestão *in vitro* usados e análise estatística dos resultados.

Os Resultados incluem os dados obtidos durante a execução prática do tema incluindo: Recuperação de patulina - estabilidade da patulina, influência do método de extração, influência da digestão e presença/ausência de refeição, variações intra- inter-amostras -; Efeito da matriz alimentar na bioacessibilidade de patulina – esparguete à bolonhesa, guisado de borrego e bolacha maria – por fim, a comparação dos modelos *in vitro* de adulto e infantil.

A Discussão e perspectivas futuras onde é feita uma apreciação global do trabalho onde se discute os resultados obtidos em cada experiência comparando-os sempre que possível com resultados de outros autores. É ainda feita uma abordagem a aspetos a melhorar para estudos posteriores.

As referências bibliográficas deste trabalho foram organizadas segundo as regras para redação de manuscritos da revista ‘Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences’.

1- Introdução

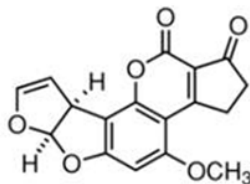
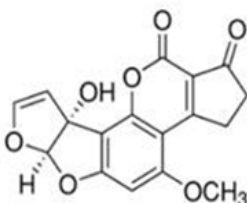
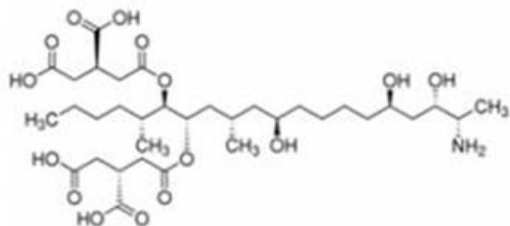
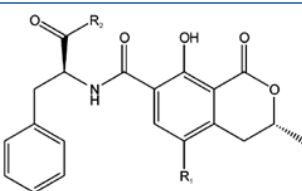
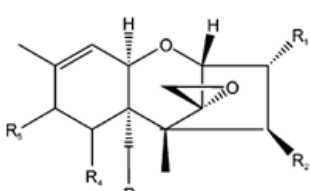
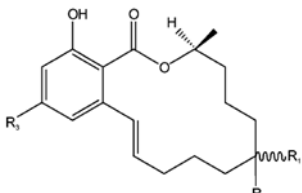
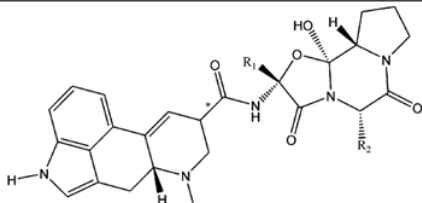
1.1- Micotoxinas

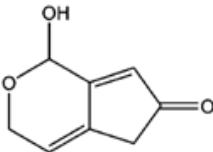
Organismos produtores, caracterização química e carcinogénica

Os fungos têm a capacidade de produzir substâncias farmacologicamente ativas que ao longo dos anos têm sido utilizadas para proveito dos humanos, como a penicilina por exemplo, um antibiótico com bastante importância na nossa saúde (Henk et al., 2011). Por outro lado, estes organismos são também capazes de produzir outro tipo de substâncias com efeitos menos benéficos, as micotoxinas (Turner et al., 2009). Os fungos podem proliferar sob condições ambientais favoráveis de temperatura e humidade, produzindo metabolitos secundários denominados por micotoxinas, os quais podem entrar facilmente na cadeia alimentar através de alimentos contaminados e forragens, maioritariamente cereais (EFSA, 2013) assim como ser inalados ou absorvidos por via dérmica, produzindo graves problemas na saúde humana e animal.

Os fungos filamentosos dos géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Claviceps* são os produtores das micotoxinas com maior impacto na saúde humana, nomeadamente, aflatoxinas (AFTs), ocratoxina A (OTA), patulina (PAT), fumonisinas (FUM), zearalenona (ZEN) e alguns tricotecenos incluindo o desoxinivalenol (DON), como se ilustra na Tabela 1 (Paterson & Lima, 2010). Estas toxinas podem encontrar-se em diferentes géneros alimentícios incluindo frutos, cereais, leite e derivados, vinho, café, entre outros. Segundo a IARC – *International Agency for Research on Cancer* - existem cinco grupos para classificação de compostos em função do seu potencial carcinogénico em humanos (IARC, 2013), conforme se apresenta na Tabela 2. As micotoxinas podem ser agrupadas segundo a classificação da IARC, sendo as aflatoxinas as únicas com reconhecido potencial carcinogénico para os humanos fazendo assim parte do Grupo 1 à exceção da aflatoxina M₁ (AFM₁) que está inserida no Grupo 2B sendo considerada um possível carcinogénico tal como a ocratoxina A e as fumonisinas. A patulina está inserida no Grupo 3 não sendo classificável quanto à sua carcinogenicidade. As restantes micotoxinas ainda não estão classificadas sendo necessário uma abordagem mais detalhada e completa destas substâncias de modo a conhecer os seus efeitos na saúde e classificá-las segundo o risco carcinogénico que poderão induzir (IARC, 2013), como se mostra na Tabela 2.

Tabela 1 - Micotoxinas, fungos produtores e géneros alimentícios suscetíveis de contaminação (adaptado de Shephard 2008, Koppen et al, 2010, Paterson & Lima 2010, IARC 2013)

Micotoxina	Estrutura Química	Fungo Produtor	Género Alimentício
Aflatoxina B₁, B₂, G₁ e G₂		<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Milho, trigo, arroz, sorgo, amendoim, nozes, figos
Aflatoxina M₁		Metabolito de AFB ₁ em mamíferos	Leite e derivados
Fumosinas B₁, B₂ e B₃		<i>Fusarium verticilloides</i> <i>Fusarium proliferatum</i>	Milho e derivados, sorgo e espargos
Ocratoxina		<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Penicillium verrucosum</i> <i>Aspergillus carbonarius</i>	Cereais, passa de uva, vinho e café
Tricotecenos (Desoxinivalenol)		<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i>	Cereais e derivados
Zearalenona		<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i>	Cereais e derivados
Alcaloides de Ergot		<i>Claviceps purpurea</i>	Centeio

Patulina		<i>Penicillium expansum</i> , <i>Aspergillus sp.</i> e <i>Byssoschlamys sp.</i>	Maçãs, peras e produtos derivados
-----------------	---	--	-----------------------------------

Para além das micotoxinas referidas na Tabela 1, já foram identificadas centenas de micotoxinas que exibem grande variedade estrutural, o que resulta numa grande diversidade de propriedades físicas e químicas. A maioria destes compostos são quimicamente estáveis, sendo capazes de resistir aos métodos de processamento industrial podendo permanecer no alimento e vir a exercer efeitos tóxicos após o consumo pelos humanos e animais (FSA, 2010). Devido ao impacto negativo que têm na saúde humana, produtividade animal e no comércio internacional através dos alimentos, as micotoxinas têm sido alvo de atenção política, económica e científica (Paterson & Lima, 2010).

Tabela 2 - Classificação dos agentes de acordo com o seu potencial carcinogénico em humanos segundo a IARC (IARC, 2013)

Grupo	Risco	Agentes Classificados
1	Carcinogénico	Aflatoxina B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂
2A	Provável Carcinogénico	-
2B	Possível Carcinogénico	Aflatoxina M ₁ , Fumosinas B ₁ , B ₂ e B ₃ , Ocratoxina
3	Não classificável quanto à sua carcinogenicidade	Tricotecenos, Alcaloides de Ergot, Patulina
4	Provavelmente não carcinogénico	-

Ocorrência, legislação e efeitos na saúde humana

Existem zonas do globo mais suscetíveis a uma exposição mais frequente às micotoxinas que outras. Os países menos desenvolvidos, que carecem de um manuseamento e armazenamento cuidado e seguro dos alimentos, estão associados a debilitações nutricionais e não existem regulamentos com a finalidade de proteger a saúde das populações. Nos países considerados desenvolvidos, os alimentos existem em

quantidade suficiente e existe legislação que obriga o controle dos níveis de toxinas presentes nos alimentos zelando desta forma a saúde das populações (Alvito P., 2014).

Estudos realizados no âmbito da ocorrência de micotoxinas em alimentos consumidos por humanos mostraram que existe um potencial risco, não só da presença de apenas uma micotoxina, mas da possibilidade de co-ocorrência de mais que uma micotoxina. Segundo o estudo efetuado por Tavares e colegas (2013) onde se analisaram os possíveis efeitos carcinogénicos da combinação de duas micotoxinas, aflatoxina M₁ e ocratoxina A, foi verificada a existência de uma interação entre estas, o que alerta para a importância do estudo da ação singular das micotoxinas e também da sua ação conjunta (Tavares et al. 2013).

Existem diversas instituições e organizações internacionais como a Comissão Europeia (CE), Agência Americana para o Controle de Alimentos e Produtos Farmacêuticos (FDA), Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) que reconheceram a existência de um potencial risco associado ao consumo de alimentos e rações contaminados por micotoxinas na saúde humana e animal, tendo sido elaborada legislação que visa estabelecer limites para os diferentes grupos de micotoxinas e para algumas micotoxinas em particular.

A FDA - Food and Drug Administration, organização americana que supervisiona os produtos médicos e alimentícios (FDA, 2014), determina o nível de exposição que garante a existência de uma margem de segurança adequada em relação à ocorrência deste tipo de efeitos adversos conhecidos na saúde humana. Através de estudos experimentais realizados em animais, é possível determinar esses níveis de exposição nos quais se determina a dose mais elevada que não produz efeitos adversos, o NOAEL (*No-Observed-Adverse-Effect-Level*), que é multiplicado por um fator de segurança de 100. Este cálculo conduz à estimativa do valor da dose diária tolerável provisória, PTDI (*Provisional Tolerable Daily Intake*) ou da dose semanal admissível provisória, PTWI (*Provisional Tolerable Weekly Intake*). Estas doses correspondem a valores limite de ingestão diária ou semanal e são expressas como o número de miligramas do composto por quilograma de peso corporal que podem ser consumidos pelo indivíduo, por dia ou semana, durante toda a vida, sem apresentarem riscos

consideráveis para a saúde do ser humano com base nos conhecimentos atuais (WHO, 1995; FSA, 2014).

A União Europeia possui legislação que estabelece os limites máximos para os principais grupos de micotoxinas. O Regulamento N° 1881/2006 de 19 de Dezembro tem por objetivo proteger a saúde pública, mantendo os contaminantes a níveis que sejam aceitáveis do ponto de vista toxicológico para o que fixou teores máximos de certos contaminantes para alguns géneros alimentícios e estabelecendo os níveis máximos para as micotoxinas: aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂ e M₁), ocratoxina A, toxinas *Fusarium* (DON e ZEA), patulina e fumonisinas (B₁ e B₂, HT-2 e T-2) (Comissão Europeia, 2006). Esta legislação, seguida nos Estados Membros, estabelece ainda teores máximos para garantir a proteção da saúde de lactentes e crianças jovens que constituem um grupo de risco mais vulnerável em relação a outros grupos etários. Tendo em conta os diferentes níveis de toxicidade das micotoxinas, os valores permitidos nos alimentos também variam (Comissão Europeia, 2006).

A ingestão de alimentos contaminados com micotoxinas pode conduzir ao aparecimento de micotoxicoses que se manifestam de forma aguda ou crónica. Os efeitos agudos estão associados à exposição a níveis elevados de micotoxinas e caracterizam-se por uma resposta rápida como estados de auto-imunidade e alergias (Etzel R., 2006). Os efeitos crónicos estão associados a uma exposição recorrente ou prolongada a doses reduzidas, podendo causar efeitos carcinogénicos, mutagénicos, nefrotóxicos (atrofia no sistema renal), estrogénicos (perturbações no sistema reprodutor) (CAST, 2003; Barug et al., 2006), imunotóxicos (Paterson & Lima, 2010) entre outros. Quando as micotoxinas interferem com o sistema imunitário humano, o seu efeito torna-se mais grave uma vez que o organismo fica suscetível a outras doenças nomeadamente, infecciosas oportunistas. Cada micotoxina tem um efeito específico no organismo, originando uma micotoxicose com sintomas particulares (Paterson & Lima, 2010).

1.1.1- Patulina

Em virtude de ser alvo deste estudo, será apresentado uma seção específica relativa a esta micotoxina.

A patulina (PAT), ou 4-hidroxi-4H-furo[3,2-c]piro-2(6H)-ona, é uma micotoxina incluída no grupo das lactonas, e é produzida por géneros de fungos como *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. e *Byssochlamys* sp., que podem contaminar diversos alimentos, em particular a maçã e produtos derivados (Marin et al., 2013). As maçãs contaminadas por estes fungos apresentam um bolor azul característico, constituído pelo fungo e pela micotoxina (Baert et al., 2007a, Brandon et al., 2012).

A principal fonte de exposição humana à patulina reside na ingestão de produtos à base de maçã ou outros frutos (sumos, purés ou derivados) produzidos industrialmente ou artesanalmente, usando fruta deteriorada resultando num alimento contaminado (Leggott & Shephard, 2001; Baert et al., 2007b; Barreira et al., 2010). O crescimento dos fungos produtores de patulina é influenciado pela temperatura, apresentando maior produção entre os 4 e os 25°C. A patulina é resistente ao calor, no entanto, degrada-se durante o processo de fermentação alcoólica (Brandon et al., 2012; Raiola et al., 2012a). Esta micotoxina apresenta uma forte afinidade para os grupos sulfidrilo o que explica a sua atividade inibitória em muitas enzimas (Marin et al., 2013).

Num estudo realizado em sumos e purés comercializados em Portugal, foi possível verificar que os níveis de patulina se encontram abaixo dos níveis regulamentados para alimentos à base de maçã destinados a lactentes e crianças jovens (10 µg/kg) e para sumos de fruta (50 µg/kg) o que demonstra que a qualidade destes produtos é aceitável (Barreira, 2010). Baert e colaboradores (Baert et al., 2005) verificaram que a exposição das crianças belgas a esta micotoxina através do consumo de alimentos à base de maçã, atingiu ou excedeu a dose diária admissível máxima provisória, PMTDI (*Provisional maximum tolerable daily intake*).

Estes trabalhos revelam a importância de reforçar o número de estudos sobre os efeitos tóxicos desta micotoxina, nomeadamente em crianças com idade inferior a um ano, por forma a estimar o risco de exposição destas crianças a esta micotoxina atendendo a que os alimentos infantis, em especial à base de maçã, correspondem a cerca de 23% da sua dieta (Brandon et al., 2012). De igual forma é fundamental assegurar a qualidade das maçãs que são utilizadas no processamento de produtos derivados por forma a reduzir o risco de contaminações por patulina.

Diferentes estudos de toxicidade em ratos, revelaram que esta toxina possui capacidade genotóxica, mutagénica, imunossupressora e neurotóxica. No entanto, não se obteve nenhum resultado conclusivo relativamente à sua carcinogenicidade em humanos, pelo que a IARC a incluiu no grupo 3 juntamente com outros compostos para os quais não existe evidência de efeitos carcinogénicos para os humanos (IARC, 1998).

Os diferentes grupos etários respondem de forma diferente aos efeitos desta micotoxina atendendo ao seu desenvolvimento fisiológico. Os lactentes e crianças jovens são um grupo particularmente vulnerável e que está mais exposto à contaminação com patulina devido à relação de baixa massa corporal e ao elevado consumo de produtos alimentícios à base de maçã quando comparados com os adultos (Barreira et al., 2010; Brandon et al., 2012). Segundo o Regulamento (CE) 1881/2006 que fixa os teores máximos de contaminantes para os alimentos, é estipulado o valor de 10 µg/kg para a patulina em alimentos destinados a lactentes e crianças jovens (Comissão Europeia, 2006a).

1.2- Determinação analítica de micotoxinas

Preparação das amostras

Na análise de amostras contaminadas com micotoxinas, a preparação da amostra engloba geralmente procedimentos de extração e purificação antes da detecção e quantificação final (Shephard 2008; Turner et al., 2009; Koppen et al., 2010). Na análise cromatográfica a preparação da amostra tem por objetivo transferir o analito em estudo da matriz original para uma forma mais adequada que seja compatível com o sistema analítico, reduzir ou eliminar interferentes da matriz que possam influenciar o resultado final e concentrar o analito de forma a obter uma concentração adequada ao sistema de medição (Supelco, 2013).

As técnicas de preparação de amostras utilizadas para a análise de micotoxinas em alimentos são baseadas principalmente em técnicas de extração líquido-líquido - LLE (MacDonald et al., 2000) e na extração em fase sólida - SPE (Boonzaaijer et al., 2005; Spadaro et al., 2007; Krska et al., 2008) antes da análise por cromatografia líquida de alta e/ou ultra pressão – HPLC e/ou UPLC.

1.2.1- Cromatografia

A cromatografia é um termo que designa não um método mas um conjunto de métodos que permitem separar e identificar componentes de uma mistura (Simões et al., 2003). A separação destes componentes resulta então das diferenças nas velocidades dos componentes arrastados pela fase móvel (solvente líquido ou gasoso), dadas as diferentes interações com a fase estacionária (sólida ou líquida aderente a um meio de suporte poroso) (Pombeiro, 1983).

Em 1903, o botânico russo Mikhail S. Tsvet, considerado fundador da cromatografia, apresentou o seu primeiro trabalho sobre a técnica que consistiu na separação de pigmentos de folhas. Esta técnica veio a ser conhecida mais tarde como cromatografia líquida de adsorção (Scott, 2012). Os vários métodos cromatográficos podem ser classificados atendendo à natureza do processo de distribuição e sub-classificados segundo o estado físico das fases móvel e estacionária (líquido, sólido ou gasosa) (Pombeiro, 1983; Simões, et al., 2003).

Cromatografia Líquida

A cromatografia líquida consiste numa fase móvel líquida e num suporte sólido que pode estar distribuído sobre uma superfície plana (cromatografia planar), ou no interior de uma coluna (cromatografia em coluna). Na cromatografia líquida em coluna, o solvente flui através da coluna arrastando as partículas que não são adsorvidas à fase estacionária. A cromatografia líquida em coluna permite que o fluxo da fase móvel ocorra por ação da gravidade ou através da pressão aplicada por uma bomba, como ocorre através do sistema de alta precisão (Scott, 2012).

As amostras a serem analisadas devem ser purificadas e dissolvidas antes de colocadas num aparelho mais sensível a partículas de dimensões mais reduzidas (<10 microns) como a cromatografia líquida de alta precisão, HPLC, ou ainda a cromatografia líquida de ultra precisão, UPLC, com uma sensibilidade ainda maior (Koppen et al., 2010; Waters, 2013).

1.2.2 - Extração em Fase Sólida (SPE) – Purificação Amostras

A extração em fase sólida – SPE, é uma técnica utilizada para a rápida e seletiva preparação e purificação de uma amostra líquida através de uma fase estacionária sólida (resina ou adsorvente) antes de se proceder à análise cromatográfica. A técnica de SPE permite aumentar o tempo de vida de um sistema cromatográfico e melhorar a análise qualitativa e quantitativa graças à remoção de interferentes e concentração da amostra (Krska et al., 2008; Barreira et al., 2010; Koppen et al., 2010; Sigma, 2014).

O SPE é uma cromatografia líquida-sólida em coluna e é baseada nos princípios da cromatografia líquida onde a amostra é introduzida numa coluna ou cartucho que contem na sua composição partículas apropriadas ou outras formas de material cromatográfico compactado. O solvente - fase móvel- flui através da coluna. Através da combinação apropriada entre a fase móvel e a fase estacionária, os componentes da amostra passam diretamente através da coluna (gel) ou ficam seletivamente retidos (Sigma, 2014).

Na técnica de SPE são usualmente utilizadas colunas ou cartuchos constituídas por um plástico ou vidro resistente ao solvente. A utilização de cartuchos na técnica de SPE tem várias vantagens: baixo custo, maiores recuperações, protocolos rápidos, maior

segurança (menor exposição a agentes tóxicos), maior precisão e ausência de problemas de emulsão (Waters, 2013).

Pectinase

A pectinase é uma enzima utilizada para clarificar sumos de maçã turvos e purés para auxiliar na extração da patulina (r-biopharm, 2012). A função é quebrar ou transformar a molécula de pectina. A pectina é uma substância que auxilia na estabilidade das paredes celulares das plantas. A adição desta enzima permite a clarificação dos sumos de fruta ou vegetais melhorando os resultados da extração, no entanto é um passo experimental opcional (GMO, 2010; Sagu et al., 2014).

1.2.3- Cromatografia Líquida de Alta Precisão – HPLC

A cromatografia líquida de alta precisão é das ferramentas mais utilizadas na química analítica pois tem a capacidade de separar, identificar e quantificar componentes presentes em qualquer amostra que possa ser dissolvida. Compostos com concentrações vestigiais na podem ser facilmente detetadas com recurso a este método (Krska et al., 2008; Koppen et al., 2010; Waters, 2013). A alta pressão aplicada por uma bomba, força a fase móvel líquida a migrar através da coluna (Simões et al., 2003). Esta técnica permite a separação de componentes de uma amostra com elevada resolução e em tempos relativamente curtos (minutos a uma hora). A técnica de HPLC, devido às suas características, é bastante utilizada para determinação de compostos em amostras de produtos alimentares, farmacêuticos, cosméticos, amostras forenses, químicos industriais, matrizes ambientais e nutracêuticos (Waters, 2013).

Os modos de eluição do HPLC podem ser por gradiente onde a composição da fase móvel varia ao longo do tempo, ou isocrático onde a composição se mantém constante ao longo do tempo de corrida (Barreira, 2009). O injetor, injeta a amostra no fluxo contínuo da fase móvel que a transporta até ao interior da coluna de HPLC que contém uma fase estacionária, essencial para a separação dos componentes da amostra (Waters, 2013). As colunas utilizadas neste tipo de cromatografia podem variar em dimensão, diâmetro e enchimento consoante o tipo de material que se pretende analisar. Pode ser utilizada ainda uma pré-coluna que tem como finalidade reter compostos indesejáveis, funcionando como um filtro. Para ser possível detetar a presença de um

composto, é necessário a existência de um detetor constituído por uma célula de fluxo que pode ser ultravioleta, no caso de o composto absorver radiação UV; fluorescente, se o composto fluorescer ou ainda universal como o ELSD, *evaporative-light-scattering detector* (Krska et al., 2008; Shephard 2008; Koppen et al., 2010). É possível utilizar mais que um detetor em simultâneo o que permite resultados mais informativos e claros (Waters, 2013).

Os tipos de separação utilizados nas técnicas de HPLC, baseiam-se nas características químicas dos compostos utilizados, nomeadamente a polaridade (atração ou repulsa de moléculas, por exemplo uma fase estacionária e uma fase móvel com polaridades opostas, os compostos presentes na amostra irão competir por diferentes polaridades), a carga elétrica (força acídica ou alcalina dos iões e capacidade de atrair/repelir iões) e o tamanho molecular (fase estacionária sintetizada com poros de diferentes dimensões). Na separação por polaridade, quanto mais atraído for um composto à fase estacionária, mais lento vai ser o seu arrastamento pela fase móvel, o oposto ocorre quando o composto é fortemente atraído pela fase móvel, sendo o mais rápido a eluir. Os mecanismos de retenção utilizados podem ser de fase normal com a fase estacionária polar e a fase móvel apolar ou, de fase reversa com as fases estacionária e móvel ao inverso da retenção normal. A fase reversa é atualmente a mais utilizada devido à sua reprodutibilidade (Pombeiro, 1983; Barreira, 2009; Waters, 2013).

Um cromatograma é a representação da separação química que ocorreu no sistema de HPLC. Da linha de base surgem uma série de picos ao longo de um eixo temporal, cada pico representa a resposta do detetor a um composto diferente. Cada eluente tem uma localização específica medida com base no tempo entre o momento da injeção e o pico máximo. Por comparação de cada tempo de retenção para cada pico da amostra a uma referência padrão, o cromatografo é capaz de identificar cada componente. As informações fornecidas pelo detetor permitem calcular a concentração de cada componente na amostra, quanto mais concentrado estiver o analito mais forte será o pico e maior será a área do pico (Waters, 2013).

A técnica de HPLC permite ainda realizar a purificação de compostos numa amostra, recolhendo os analitos individualmente à medida que vão sendo eluídos da coluna, esta particularidade denominada de cromatografia preparativa. Esta técnica

permite assim a realização da purificação, quantificação e identificação de compostos (Barreira et al., 2010; Waters, 2013).

1.2.4- Outros métodos analíticos

Existem outros métodos analíticos para a quantificação das micotoxinas em alimentos para além do HPLC-UV ou HPLC-FL, nomeadamente o LC-MS (espectrometria de massa) e a cromatografia gasosa acoplada a vários detetores como de ionização de chama, de captura eletrónica ou de massa. Como estes métodos são geralmente dispendiosos existem outros que foram desenvolvidos para serem de execução simples como é o caso do método ELISA, ‘enzyme-linked immunosorbent assay’ utilizado no rastreio de micotoxinas em diferentes tipos de alimentos (WHO, 1995; Barreira et al., 2010). Estes métodos permitem um aumento da seletividade, eficiência e eficácia na determinação de micotoxinas em diferentes matrizes.

1.3- Digestão Humana

Conceitos gerais

Após a ingestão, o alimento é desintegrado no trato gastrointestinal num processo denominado por digestão. Os macronutrientes (proteínas, lípidos e carboidratos) são transformados por processos físicos – mecânicos-, e químicos – sucos digestivos-, em moléculas mais pequenas, biologicamente ativas que são absorvíveis pelas células do nosso organismo. A digestão é o passo fundamental para a distribuição de compostos que irão exercer efeitos benéficos e/ou deletérios no organismo humano (Tortora & Derrickson, 2009; Ménard et al., 2014).

A fisiologia do processo digestivo varia entre indivíduos e é influenciada por diversos fatores como o tipo de alimentos, quantidade de refeição e desenvolvimento fisiológico individual. Numa pessoa adulta saudável este processo demora cerca de 24 a 72 h (González-Arias et al., 2013).

A ingestão de alimento conduz a diversas mudanças no trato gastrointestinal: aumento da secreção de ácido gástrico, biliar e sucos pancreáticos; modificação dos padrões de motilidade gástrica e intestinal e ainda alterações no fluxo de linfa e sangue visceral (Versantvoort et al., 2004).

O volume dos fluidos disponíveis no trato gastrointestinal para que um composto se dissolva é dependente do volume de secreções e fluxo de água ao longo da parede do tubo digestivo. No total, cerca de 6 litros de secreções são necessárias por dia para a normal digestão dos alimentos, 1 litro de saliva, 2 litros de suco gástrico, 2 litros de suco pancreático e 1 litro de biliar (Tortora & Derrickson, 2009). Em adição, o intestino ainda secreta cerca de 1 a 2 litros de muco protetor das células epiteliais e que melhora o contacto entre o conteúdo luminal e as células para melhor absorção. No total o intestino delgado absorve entre 7 a 8 litros de fluido por dia, sendo que apenas 1,5 litro atinge o colón onde se dá a reabsorção de 1,3 litros, o restante faz parte da formação do quilo (Versantvoort et al., 2004).

O estudo da cinética da digestão e da digestão do bolo alimentar é possível através da monitorização dos componentes do bolo no trato gastrointestinal. Existem componentes físicos (alimento líquido ou sólido) e químicos (nutrientes) que podem ser

monitorizados. O bolo alimentar por si só pode ser analisado como uma entidade física por métodos de imagem (ressonância magnética e ecografia), mas também pode ser analisado mais minuciosamente por métodos indiretos como a detecção de nutrientes na circulação sanguínea por exemplo. A análise integrada destes parâmetros é necessária para a compreensão da digestão de diferentes matrizes alimentares (Barbé et al., 2013).

De uma forma simplificada, pode dizer-se que ocorrem três fases principais no processo digestivo: a fase oral que ocorre na boca, a fase gástrica no estômago e fase duodenal no duodeno, como a seguir se detalha.

Fase Oral: Saliva

Na fase oral ocorre a mastigação e deglutição do alimento formando o bolo alimentar. O alimento é colocado no interior da cavidade bucal, mastigado e envolvido pela saliva produzida pelas glândulas salivares. A produção de saliva é estimulada pelo paladar, mastigação e texturado alimento. A composição da saliva é dependente da taxa de fluxo a que é produzida: quanto maior a estimulação maior a concentração de sódio, cálcio, cloro, bicarbonato e α -amílase enquanto as concentrações de fosfato e mucina diminuem, já a concentração de potássio mostra pouca alteração (Versantvoort et al., 2004). O valor do pH no interior da cavidade bucal é de aproximadamente 6,8 e o tempo de digestão neste compartimento é em média de 5 min, sendo esta a fase digestiva de menor duração (Versantvoort et al., 2005).

Fase Gástrica: Suco Gástrico, Esvaziamento e pH

Depois de mastigado e engolido, o alimento é empurrado pelo esófago através de movimentos peristálticos (contrações da musculatura lisa ao redor do tubo) até ao estômago. No estômago ocorre a digestão do bolo alimentar por ação da pepsina que quebra as proteínas e o ácido gástrico que auxilia na digestão dos triglicéridos, assim forma-se o quimo que segue posteriormente para o duodeno. O esvaziamento gástrico é determinado por três fatores: o volume da refeição, a pressão osmótica e o conteúdo calórico do alimento. As taxas de esvaziamento para alimentos ricos em gordura, carboidratos e proteínas são reguladas para que o número de calorias distribuído ao duodeno seja igual ao longo do tempo (2 kcal/min). O valor do pH gástrico em condições de jejum varia entre 1,5 e 2 e quando se dá o contacto com o alimento aumenta temporariamente para 3 até 7. Durante o esvaziamento, o pH vai diminuindo gradualmente até que o valor inicial seja restabelecido (Versantvoort et al., 2004;

Tortora & Derrickson, 2009). Um alimento fluido geralmente demora 10 a 60 min. a sair do estômago para o duodeno. Alimentos sólidos, dependendo da sua concentração calórica, variam de 60 a 277 min. (Versantvoort et al., 2004).

Fase Duodenal: Bílis, Suco Pancreático, tempo de residência e pH

Na fase duodenal dá-se a conversão do quimo, vindo do estômago, a quilo. A bílis é essencialmente produzida no fígado e a sua secreção é estimulada pela presença de gorduras (lípidos) no duodeno e depende da quantidade e tipo de gorduras. A vesícula biliar só se enche de bílis quando o estomago se encontra quase vazio. Com a entrada de gorduras (lípidos) no duodeno, a vesícula biliar contrai-se e ocorre um pico de concentração de bílis. Ao longo do tempo vai ocorrendo uma diminuição constante desta concentração, proporcional à quantidade de gorduras ainda presentes por lisar (fragmentar) (Versantvoort et al., 2004; Tortora & Derrickson, 2009).

Os sucos pancreáticos são secretados em resposta à presença de quimo semi-sólido no duodeno. Ocorre a secreção de bicarbonato que neutraliza a quantidade de ácido que entra no duodeno, enquanto as enzimas iniciam a digestão dos três principais tipos de alimento (proteínas, hidratos de carbono e lípidos) (Versantvoort et al., 2004; Tortora & Derrickson, 2009).

O período médio de trânsito intestinal no intestino delgado é de 3 horas (varia de 1 a 6 horas) (Malagelada *et al.*, 1984 in Versantvoort et al., 2004). Os valores do pH no intestino delgado aumentam gradualmente entre o duodeno e o ílio de 5,5 a 7,5. Após a ingestão do alimento o pH no duodeno é inferior, 5 a 5,5 quando comparado com o valor em jejum, cerca de 6. No entanto, no jejunum não se verifica grandes diferenças no pH após a ingestão de alimento, 6 a 6,5 (Tortora & Derrickson, 2009).

1.3.1- Noção de BioDisponibilidade e Bioacessibilidade

A quantidade total de contaminante ingerido (dose externa) nem sempre reflete a quantidade que está disponível no organismo (dose interna), apenas uma certa quantidade está biodisponível. Ou seja, apenas uma proporção do contaminante que é ingerido irá atingir a circulação sistémica podendo exercer o seu efeito tóxico. Dependendo do tipo de preparação, processamento e fonte do alimento, a biodisponibilidade dos componentes presentes poderá ser diferente, pelo que em

alimentos com a mesma quantidade de contaminantes na sua matriz alimentar, em determinadas condições poderá exercer efeito tóxico enquanto noutra matriz alimentar a mesma quantidade poderá não causar qualquer efeito (Versantvoort et al., 2005).

A biodisponibilidade de um determinado composto pode ser considerada como resultado de três processos:

- 1- Libertação do composto da sua matriz por ação do suco digestivo no trato gastrointestinal – bioacessibilidade;
- 2- Transporte através do epitélio intestinal pela *veia Porta* – transporte intestinal;
- 3- Degradação do composto no fígado e intestino – metabolismo.

Para um contaminante estar biodisponível no organismo, é necessário que este se liberte do alimento ingerido através do processo digestivo ao longo do trato gastrointestinal. Apenas uma fração que é libertada da matriz alimentar ficará disponível, bioacessível, para absorção. O contaminante poderá ser em parte degradado ou transportado através do epitélio intestinal, sendo posteriormente degradado no fígado consoante as suas características específicas. A biodisponibilidade pode ser encarada assim como a consequência da bioacessibilidade, absorção e metabolismo (Versantvoort et al., 2004, 2005; González-Arias et al., 2013).

A determinação da bioacessibilidade que um contaminante tem numa determinada matriz alimentar pode ser considerada como um indicador para a biodisponibilidade máxima desse contaminante (Versantvoort et al., 2005).

1.3.2- Modelos de Digestão *in vitro*

Apesar da relevância fisiológica que têm, os ensaios *in vivo* nem sempre podem ser realizados devido a questões éticas, constrangimentos técnicos, custo e à grande variabilidade inter-individual. Por forma a ultrapassar estas dificuldades, uma forma alternativa de realizar estes estudos é recorrer aos sistemas *in vitro* (Hur et al., 2011; Ménard et al., 2014; Assunção et al., 2014).

A quantificação da biodisponibilidade e bioacessibilidade de um composto é um processo complexo. No sentido de poder quantificar estes dois parâmetros, foram desenvolvidos modelos de digestão *in vitro* que simulam, de uma forma mais ou menos

simplificada, o processo digestivo na boca, estômago e intestino delgado. Esta metodologia veio permitir estimar os efeitos das matrizes alimentares na biodisponibilidade de determinados contaminantes. A simulação do processo digestivo consiste na mimetização das condições fisiológicas no humano, ou seja, composição química dos fluídos, pH e períodos de incubação em cada compartimento (Versantvoort et al., 2005).

Os ensaios *in vitro* concebidos para a digestão consistem numa sucessão de biorreações que recriam o ambiente nos diferentes compartimentos do trato digestivo por onde o alimento passa. Em cada compartimento (boca, estomago e duodeno) as condições de pH, temperatura, força iónica e concentrações enzimáticas são recriadas e ajustadas. Estes modelos são simples e fáceis de usar mas, no entanto, não são fisiologicamente realistas uma vez que é extremamente complicado recriar todas as condições complexas existentes no trato gastrointestinal. As condições bioquímicas transientes, as enzimas utilizadas (geralmente de origem não-mamífera), as concentrações enzimáticas e iónicas, o fluxo do alimento através dos diferentes compartimentos e ainda o microbiota existente no organismo, são exemplos de fatores fisiológicos que são complicados de simular em laboratório mas que têm sido estudados por forma a desenvolver modelos de digestão cada vez mais fiáveis (Guerra et al., 2012; Kopf-Bolan et al., 2012; Meca et al., 2012). São ainda de considerar outros fatores como os parâmetros individuais, estado fisiológico e patológico de cada pessoa difíceis de recriar nos modelos digestivos. Relativamente à matriz alimentar há que ter em conta os constituintes da matriz, a sua estrutura, o processamento pelo organismo e o seu comportamento em estados de jejum ou abstinência, Figura 1 (Guerra et al., 2012).



Figura 1 - Parâmetros que influenciam o sistema gástrico e duodenal (SGD) em estudos de nutrição e saúde (adaptado de Guerra et al., 2012)

Modelos estáticos

Por forma a aproximarmos da realidade fisiológica, têm sido desenvolvidos sistemas de digestão *in vitro*, estáticos e dinâmicos. Os modelos estáticos simulam, de uma forma simplificada, o processo digestivo na boca, estômago e intestino delgado omitindo processos fisiológicos como os movimentos peristálticos ou a existência da microbiota intestinal (Gonzalez-Arias et al., 2013). Associado ao estudo das micotoxinas, um dos modelos estáticos utilizados é o desenvolvido por Gil-Izquierdo e colaboradores (Gil-Izquierdo et al., 2002) que consiste em apenas dois passos sequenciais: uma ação inicial conjunta da saliva, pepsina e ácido clorídrico que simula a digestão na boca e estômago, e uma segunda digestão por ação dos sais biliares e pancreatina que simulam as condições no duodeno. O modelo estático de digestão *in vitro* mais vulgarmente utilizado, conhecido como modelo RIVM, descreve um procedimento de três passos (boca, estômago e intestino delgado), conforme se ilustra na Figura 2. Uma vez que os processos de digestão e absorção dos componentes dos alimentos ocorrem essencialmente a nível do intestino delgado, o intestino grosso não é considerado neste modelo (Versantvoort et al., 2005; González-Arias et al., 2013). Este

modelo tem sido amplamente utilizado em vários estudos para simular o trato gastrointestinal humano (Brandon et al., 2006; Kabak et al., 2009; Versantvoort et al., 2004, 2005)

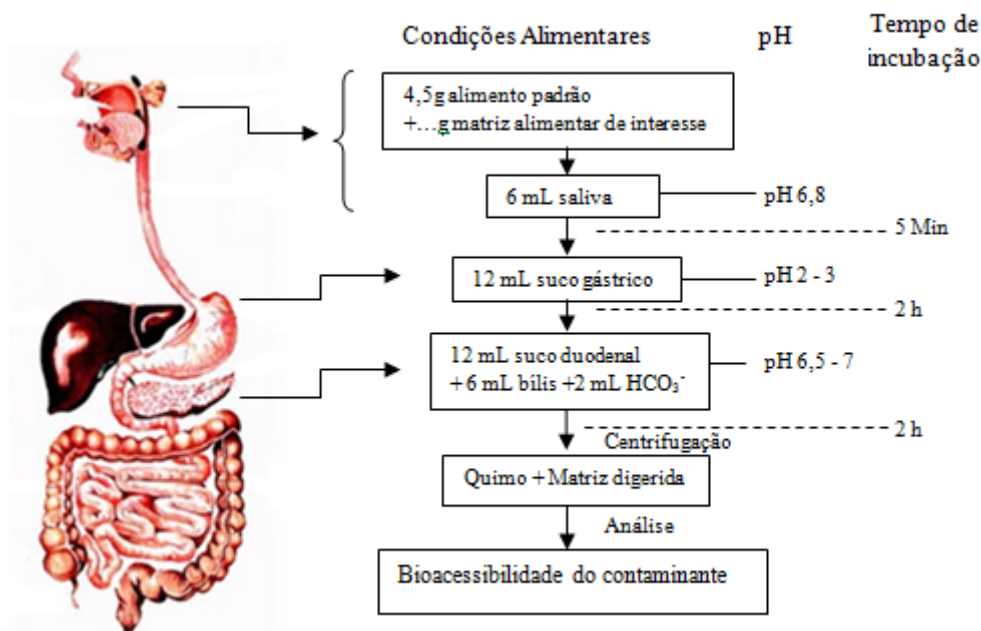


Figura 2- Representação- esquemática das condições experimentais de um modelo de digestão *in vitro* de três etapas que simula o processo digestivo de um alimento na boca, estômago e intestino delgado (adaptado de Versantvoort, et al., 2005; InfoEscola, 2013).

Nestas condições o processo de digestão é simulado com a adição da quantidade de alimento a ser digerido, 4,5 g para uma quantidade de sucos de 6 ml saliva, 12 ml gástrico, 12 ml duodenal, 6 ml bÍlis. Cada um dos sucos é constituído por uma componente inorgânica, orgânica e enzimática característica. No final da digestão a amostra digerida é extraída e analisada (Versantvoort et al., 2005).

Os modelos dinâmicos, de uma forma mais sofisticada que os modelos estáticos, permitem a regulação do pH, fluxos dinâmicos do alimento e da concentração das enzimas nos diversos compartimentos. No entanto, este sistema de digestão *in vitro* dinâmico apresenta custos mais elevados e carece de um manuseamento mais simples (Ménard et al., 2014).

Digestão em crianças

Atendendo às condições fisiológicas particulares encontradas em crianças, sabe-se que são uma classe da população bastante vulnerável a contaminantes alimentares,

acrescentando também o fato de possuírem uma dieta alimentar restrita geralmente à base de produtos lácteos, cereais e vegetais, com um consumo superior relativamente à sua massa corporal, comparando aos adultos. Estes factos aumentam o risco de contaminação alimentar em crianças colocando em causa o seu estado de saúde, tornando importante a deteção de qualquer contaminante nos géneros alimentícios.

De acordo com as recomendações pediátricas recentes, diversos alimentos não apresentam a composição nutricional mais ajustada às necessidades de desenvolvimento cognitivo e crescimento das crianças. Como tal têm sido desenvolvidas fórmulas que ajudam a satisfazer as necessidades nutricionais das crianças, podendo assim fornecer proteínas, cálcio, vitamina D e Ferro essenciais ao crescimento e desenvolvimento dos ossos e cognição. É importante que a criança tenha uma alimentação variada, equilibrada e um modo de vida saudável (Unicef, 2006; Alvito et al. 2010).

Os sumos de fruta representam um tipo de alimento muito útil para satisfazer as recomendações sobre uma alimentação mais saudável, sendo uma forma prática de consumir fruta e vegetais (López-Nicolás et al., 2014). Este tipo de sumos são bastante consumidos por crianças e grande parte das vezes servem de acompanhamento à refeição.

O modelo de simulação de digestão representado na Figura 2, mimetiza as condições encontradas no processo digestivo em adultos, pelo que existe a necessidade de desenvolver um simulador digestivo para crianças de modo a que seja possível obter resultados transponíveis para este grupo (Bourlieu et al., 2011). O processo digestivo infantil difere do adulto em diversos fatores fisiológicos. As alterações principais consistem na alteração de valores de pH, e na quantidade de determinadas enzimas: o pH do suco gástrico é alterado de 2 para 3; a quantidade de pepsina é reduzida de 1,25 g para 0,02 g, a pancreatina é reduzida de 4,5 g para 0,0005 g e a bÍlis é reduzida de 1,237 para 0,03 g (Raiola et al., 2012b).

1.4- Objetivos

Dada a vulnerabilidade das crianças a micotoxinas, a sua frequente ingestão de sumos ou produtos à base de maçã, e a necessidade de conhecer os valores reais de patulina que estarão disponíveis, após digestão, para exercer os efeitos tóxicos (dose interna), foram incluídas nesta dissertação os seguintes objetivos:

- i) Estudo da bioacessibilidade de patulina em amostras de sumos. Nesta etapa incluiu-se o estudo da (a) estabilidade da patulina ao longo do tempo, (b) método de extração da patulina, (c) aplicação do método de digestão e extração e (d) variação intra/inter amostras.
- ii) Análise do efeito da matriz alimentar na bioacessibilidade de patulina: influência de diferentes tipos de refeição (a) esparguete à bolonhesa e (b) guisado de borrego e (c) bolacha maria.
- iii) Estudo comparativo da digestão com os modelos *in vitro* de adulto e infantil

Para confirmar que os resultados de bioacessibilidade de patulina são reais e que não ocorreu interferência de outros fatores externos como a estabilidade da própria toxina ao longo do tempo, a limitação das técnicas de extração na recuperação da toxina, a interferência do processo de digestão e a variabilidade entre amostras para o próprio e em dias diferentes, foram efetuados ensaios prévios sobre estas quatro componentes. Como a ingestão dos sumos poderá ocorrer em simultâneo com outros alimentos, nomeadamente de natureza sólida, foi estudada o efeito de diferentes matrizes sólidas, refeições, na bioacessibilidade dos sumos. Estes alimentos foram escolhidos com base na sua composição (vegetais, carnes, massas, cereais, etc.) e quantidade calórica, adequadas ao consumo infantil como refeições de homogeneizados de carne (esparguete à bolonhesa e guisado de borrego) e bolachas (sendo a bolacha maria a mais consumida habitualmente). Como a digestão nos adultos e crianças é diferente, foi efetuado um estudo comparativo da aplicação do mesmo método de digestão com a caracterização de cada tipo de população.

2- Materiais e Métodos

2.1- Amostras

Neste estudo foram utilizados 9 sumos de frutos (6 turvos e 3 límpidos) e 3 refeições sólidas (uma de massa, uma de carne e uma de bolachas), devidamente identificados nas Tabelas 3 e 4, respetivamente. As amostras foram adquiridas em hipermercados na região de Lisboa entre Outubro de 2013 e Janeiro de 2014.

A seleção dos sumos baseou-se na sua composição (presença de maçã entre 4 e 100%) e natureza (turvo e límpido) como se apresenta na Tabela 3. A identificação dos sumos incluiu um código interno de entrada no laboratório e uma designação para facilitar a sua referência ao longo do texto. A seleção das refeições sólidas baseou-se nos alimentos mais comuns potencialmente consumidos pelas crianças portuguesas segundo a autora e de acordo com o valor calórico das refeições (Versantvoort et al, 2005).

Para os estudos de bioacessibilidade, todas as amostras de sumo foram contaminadas artificialmente com patulina para uma concentração de 200 µg/kg e mantidas congeladas a -20°C durante o período de estudo de 5 meses. Seguidamente foram efetuados os ensaios de i) bioacessibilidade de patulina em sumos usando 4 amostras: 8 Frutos, Tropical, Maçã e Maçã e Cenoura, ii) bioacessibilidade da patulina em sumos com diferentes refeições usando as amostras: Multifrutos1, Frutos Variados, Multifrutos2, 100% Maçã equilíbrio, cocktail jr. e Maçã-Cenoura com a refeição esparguete à bolonhesa e as amostras: 8 Frutos, Tropical, Maçã e Maçã e Cenoura com as refeições de guisado de borrego e bolacha maria; e iii) bioacessibilidade da patulina em sumos usando dois métodos diferentes de digestão *in vitro* (adulto e criança), usando 4 amostras: 8 Frutos, Tropical, Maçã e Maçã e Cenoura. Nos ensaios de recuperação de patulina, os sumos foram fortificados após a sua digestão com e sem refeição.

Os 6 sumos: Multifrutos1, Frutos Variados, Multifrutos2, 100% Maçã equilíbrio, Cocktail jr. e Maçã-Cenoura foram utilizados na determinação de bioacessibilidade de patulina na presença da refeição de esparguete à bolonhesa, e incluídos no âmbito da publicação ‘Applicability of *in vitro* Methods to Study Patulin Bioaccessibility and Its Effects on Intestinal Membrane Integrity’ (Assunção et al., 2014), Anexo 1 desta dissertação. As amostras utilizadas neste ensaio tiveram como critério de escolha a disponibilidade de armazenamento, variedade da composição e natureza dos sumos.

Tabela 3 – Identificação das amostras de sumo de frutos usadas no estudo da bioacessibilidade de patulina.

Código interno	Designação	Composição	Natureza
246917	Multifrutos 1	Sumo de: ananás (44%), tangerina (18%), laranja (18%), manga (6%), maçã (5%), goiaba (5%), maracujá (2%), limão (1%), kiwi (1%) a partir de concentrado	Turvo
246916	Frutos Variados	Sumos de fruta (laranja, maçã, pera, ananás) à base de concentrado, vitamina C	Turvo
246920	Multifrutos 2	Sumo de: ananás (44%), tangerina (18%), laranja (18%), manga (6%), maçã (5%), goiaba (5%), maracujá (2%), limão (1%), kiwi (1%) a partir de concentrado	Turvo
-	100% Maçã Equilíbrio	Sumo Maçã (100%), vitamina C	Límpido
-	Cocktail Jr	Sumo de maçã (58%), sumo de laranja (24%), sumo de morango (7%), puré de banana (7%), puré de manga (3%), sumo de framboesa (1%)	Turvo
250735	8 frutos	Sumos de maçã, uva, laranja, ananás, maracujá, goiaba, alperce, manga e banana: à base de concentrados, antioxidante: ácido ascórbico.	Turvo
-	Tropical	Concentrado (85%) de ananás, laranja, maçã, maracujá, laranja, goiaba, manga, papaia, kiwi. Vitaminas: A, B6, C, D e E	Turvo
-	Maçã	Maçã (100%), vitamina C	Límpido
-	Maçã e Cenoura	Maçã (90%), Cenoura (10%), vitamina C	Límpido

- Sem código interno

Tabela 4 – Identificação das refeições sólidas usadas no estudo da bioacessibilidade da patulina

Designação	Composição
Esparguete à bolonhesa	Esparguete, carne picada, molho de tomate
Guisado de Borrego	Legumes 63.9% (batatas, cenouras, feijão verde, cebola, ervilhas), água de cozedura, borrego 8%, amido de milho, azeite 1.3% e sal.
Bolacha Maria	Açúcares (3%), matéria gorda (lípidos) (1%), gorduras saturadas (1%), sal (0.73%)

2.2- Determinação de patulina por SPE- HPLC -UV

2.2.1- Reagentes e soluções

Para a extração e análise das amostras foram adquiridos os seguintes reagentes: acetato de etilo, n-Hexano e acetonitrilo para HPLC; etanol absoluto, hidrogenocarbonato de sódio anidro, ácido acético glacial 100%, p.a.; ácido perclórico 60% e sulfato de sódio anidro p.a. e areia do mar purificada com ácido e calcinada, todos adquiridos na Merk (VWR, Portugal). A água utilizada era ultrapura com resistividade $18\text{M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ (Milli-Q da Millipore, Interface, Portugal).

A micotoxina patulina, (4-hidroxi-4H-furo (3,2-c)pirano-2(6H)-ona), $\geq 98\%$ (TLC), foi adquirida à Sigma-Aldrich (Dias de Sousa, Portugal).

Soluções gerais

- ◆ Solução NaOH 0,01 M: 4 g de NaOH diluídas em 100 mL de água ultrapura. Diluição de 1:100 desta solução em água ultrapura.
- ◆ Ácido acético em acetato de etilo: 3 mL de ácido acético glacial 100% e 97 mL de acetato de etilo.
- ◆ Ácido acético 0,2 %: 0,5 mL de ácido acético glacial diluídos em água ultrapura até 250 mL.
- ◆ Água pH=4: água ultrapura ajustada para pH=4 com ácido acético 0,2%. A solução foi armazenada a $5 \pm 3^\circ\text{C}$.
- ◆ Solução de hipoclorito de sódio a 1,3%: 2 L de hipoclorito de sódio a 2% adicionados a 1 L de água da torneira.

Soluções de extração

Solução de extração acetato de etilo-n-hexano (60+40, v/v): 180 mL de acetato etilo com 120 mL de n-hexano. A solução foi armazenada em frasco de vidro rolhado.

Fases móveis

Fase móvel para análise da patulina em HPLC: a 940 mL de água ultrapura foram adicionados 60 mL de acetonitrilo e 1 mL de ácido perclórico a 60%. A fase móvel foi filtrada através de uma membrana filtrante para soluções aquosas (tipo HV), 47 mm diâmetro, poro $0,45\ \mu\text{m}$, usando o sistema de filtração ligado a uma bomba de vácuo. Após filtração a solução foi degaseificada em banho ultra-sons.

Soluções de micotoxinas

- ◆ Patulina, 200 mg/L: Reconstitui-se 5 mg de patulina em 25 mL de acetato de etilo.
- ◆ Patulina, 10 mg/L: Evapora-se 1 mL da solução mãe de patulina em corrente de azoto e reconstitui-se o resíduo em 20 mL de acetato de etilo.
- ◆ Padrão de fortificação: efetuar uma diluição de 1:10 da solução de patulina com 10 mg/L.
- ◆ Padrão de controlo 8 µg/L: Mede-se 40 µL de solução patulina 10 mg/L para um balão de 50 mL e perfaz-se com água pH=4.
- ◆ Padrão de controlo 16 µg/L: Mede-se 80 µL de solução patulina 10 mg/L para um balão de 50 mL e perfaz-se com água pH=4.
- ◆ Padrão de controlo 25 µg/L: Mede-se 125 µL de solução patulina 10 mg/L para um balão de 50 mL e perfaz-se com água pH=4.
- ◆ Padrão de controlo 50 µg/L: Mede-se 250 µL de solução patulina 10 mg/L para um balão de 50 mL e perfaz-se com água pH=4.
- ◆ Padrão de controlo 100 µg/L: Mede-se 500 µL de solução patulina 10 mg/L para um balão de 50 mL e perfaz-se com água pH=4.

2.2.2- Extração e purificação por SPE

Cerca de 10 g de amostra foram pesadas em replicado; no caso de amostras líquidas, a toma do ensaio deve ser de 10 mL por amostra, anotando também a massa. Em cada extração um dos replicados foi fortificado com 200 µl da solução padrão de fortificação 1 µg/mL e posteriormente homogeneizado no vortex durante 3 min para completa homogeneização.

A cada um dos replicados foram adicionados 2 g areia, 15,0 g de Na₂SO₄, 2 g de NaHCO₃ e 10 mL de solvente de extração, agitou-se vigorosamente e em seguida durante 5 min num agitador mecânico. A mistura foi posteriormente centrifugada a baixa velocidade (valor indicativo – 1850 rpm ou 300-400 g), durante 1 min, em que 2,5 mL do sobrenadante são transferidos para um cartucho de extração em fase sólida (Strata SI – 1,55 µm, 70A, 500 mg/ 3 mL Phenomenex ®). O sobrenadante foi deixado eluir gota-a-gota (por ação da gravidade) para um tubo de vidro contendo 50 µL de ácido acético em acetato de etilo. A patulina foi eluída do cartucho de SPE com 3 mL de

solvente de extração e com o auxílio de uma bomba de vácuo. O eluído foi posteriormente evaporado no evaporador de corrente de azoto com banho de água Caliper®, Turbovap LV, a 20 psi e $38 \pm 2^\circ\text{C}$, durante aproximadamente 20 min. O resíduo obtido foi diluído com 1 mL de água pH=4, com auxílio de agitação em vortex durante 3 min, para assegurar a completa dissolução da patulina.

Previamente à análise, o extrato de patulina foi filtrado com filtros de seringa de PVDF (13 mm de diâmetro, poro 0,45 μm).

Pectinase

Para avaliar a influência do método de extração foi realizado, antes da extração com SPE, uma extração adicional da patulina com pectinase em dois sumos diferentes (um turvo e outro límpido- 8 Frutos e Maçã respetivamente). Este passo foi adicionado apenas com a função de clarificar os sumos e assim facilitar a extração. Para o efeito foi recolhida uma amostra de 20 mL de sumo, antes da sua extração, à qual se adicionou 150 μL de enzima e deixou atuar durante a noite. No dia seguinte a mistura foi centrifugada a 4000 rpm durante 5 min. De seguida prosseguiu-se com a extração normal.

2.2.3- Análise Cromatográfica

Procedimento e determinação de patulina

A análise por HPLC foi realizada com recurso ao aparelho Alliance modelo 2695 da Waters® com detetor ultra-violeta (Waters 2475). O software cromatográfico utilizado foi o Empower 2 e foi utilizada uma coluna analítica de HPLC, 250x4.6 mm x 5 μm , Synergi Hydro-RP C18 com uma pré-coluna associada de 4x3 mm i.d. Hydro-RP C18 (Phenomenex® Torrance, CA) (Barreira et al., 2010; Martins, 2013).

Para o procedimento analítico foram preparadas soluções que incluíam: ácido acético em acetato de etilo, ácido acético 0,2%, água pH=4, solução de extração acetato de etilo-n-hexano (60+40 v/v), fase móvel para HPLC, solução de NaOH 0,01 M, solução de hipoclorito de sódio a 1,3%, solução de patulina.

A fase móvel foi constituída por água ultrapura, acetonitrilo e ácido perclórico. A fase móvel foi filtrada por ação de vácuo através de filtros de membrana (Millipore,

Molsheim, França) e colocada num banho de ultrassons (MXB6, Grant) para desgaseificar.

As condições cromatográficas utilizadas para a deteção de patulina estão representadas na Tabela 5 e foram previamente estabelecidas de acordo com as condições descritas por Barreira e colaboradores, 2010 (Barreira et al., 2010).

Tabela 5- Condições cromatográficas utilizadas na deteção de patulina.

Parâmetro	Condições cromatográficas
Pré-coluna	C18, Phenomenex
Coluna cromatográfica	Fase reversa, Synergi RP C18, Phenomenex
Composição da fase móvel	Água:Acetonitrilo:Ácido perclórico (94:6:1)
Modo	Isocrático
Fluxo do eluente	1 mL/min
Temperatura da coluna	25°C
Temperatura do amostrador	10°C
Detetor de díodos (UV)	Comprimento de onda fixo, a 276 nm
Volume de injeção	200 µL

A curva de calibração foi preparada a partir da solução padrão de calibração (10 mg/mL), a partir da qual foram preparadas diluições para obter concentrações de 8, 16, 25, 50 e 100 µg/L de patulina. Na curva de calibração foram avaliados os coeficientes de determinação (R^2) e de variação do método (CV_m). A curva de calibração foi aceite sempre que o coeficiente de determinação foi $\geq 0,995$ e o $CV_m \geq 10\%$.

A identificação da patulina nas amostras foi feita por comparação do tempo de retenção da patulina obtido na amostra com o obtido nos padrões da curva de calibração. Esta identificação foi feita recorrendo ao *software* Empower 2. Para determinar a concentração da patulina presente na amostra foi feita uma interpolação da curva de calibração. A concentração da patulina nas amostras foi expressa em µg/kg (amostras sólidas) ou em µg/L (amostras líquidas), apresentando, no máximo, 2 algarismos significativos.

O cálculo da concentração final em µg/Kg ou µg/L presente na amostra foi feito através da equação:

$$Patulina \left(\frac{\mu g}{Kg} \right) = C \left(\frac{\mu g}{L} \right) * \frac{v3 (mL) * v1 (mL)}{v2 (mL) * mL(g)}$$

Em que:

C: concentração da solução de ensaio calculada a partir da curva de calibração

m1: massa da amostra utilizada para análise (10 g)

v1: Volume de solvente de extração (10 mL)

v2: Aliquota para SPE (2.5 mL)

v3: Volume de solução de água a pH=4 usada para dissolver o extrato (1 mL)

Se não houver alteração na massa da amostra, volume de solvente de extração e alíquota de extrato (ver 2.5.1), a equação pode ser expressa de forma abreviada:

$$Patulina \left(\frac{\mu g}{Kg} \right) = C \left(\frac{\mu g}{L} \right) * \frac{1 * 10}{2,5 * 10}$$

$$Patulina \left(\frac{\mu g}{Kg} \right) = C \left(\frac{\mu g}{L} \right) * 0,4$$

O desempenho da metodologia analítica foi avaliado através da percentagem de recuperação, calculada com recurso à seguinte fórmula:

$$Recuperação (\%) = \frac{\left[\text{Concentração analito fina na amostra} \left(\frac{\mu g}{Kg} \right) * 100 \right]}{\text{Concentração do contaminante adicionado à amostra} \left(\frac{\mu g}{Kg} \right)}$$

Os resultados dos estudos de recuperação devem cumprir os requisitos do Regulamento CE 401/2006 que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios onde para teor um de patulina < 20 µg/kg a recuperação deve ser de 50 a 120%, para 20-50 µg/kg a recuperação deve ser de 70 a 105% e para teores > 50 µg/kg a recuperação deve ser de 75 a 105% (Comissão Europeia, 2006b).

Controlos Internos de Qualidade

Para que os ensaios possam ser reproduzíveis foram cumpridos alguns requisitos de controlo de qualidade, entre os quais se incluí a realização de:

- ensaios duplicados: a preparação de um duplicado para cada amostra da série de trabalho (no caso de se analisarem diferentes tipos de matriz na mesma série de trabalho, preparou-se, pelo menos, um duplicado de cada tipo de matriz por cada 20 ou menos amostras analisadas de sumo límpido e sumo turvo);
- ensaios de recuperação – realizou-se, pelo menos, um ensaio de recuperação de patulina para cada condição analisada no sentido de se verificar a existência de interferentes nos valores de bioacessibilidade obtidos nas amostras de sumos (recuperação após digestão na presença e ausência de refeição e recuperação após digestão extraídos com e sem pectinase, preparou-se pelo menos um duplicado de cada tipo de matriz).

Os controlos cromatográficos foram aceites sempre que apresentaram um desvio <10% em relação ao valor alvo do respetivo controlo.

2.2.4- Preparação e contaminação artificial das amostras

Como as amostras não apresentavam contaminação natural, tiveram de ser contaminadas artificialmente com patulina para os estudos de bioacessibilidade. As amostras de sumos e as refeições foram homogeneizadas antes e após a contaminação. Após homogeneização (agitação manual) efetuou-se a sua contaminação artificial por forma a obter uma concentração de 200 µg/L de patulina. Por fim as amostras foram armazenadas a uma temperatura de -20°C até serem analisadas.

Para os ensaios de recuperação as amostras já contaminadas com os 200 µg/Kg de patulina, foram fortificadas com 20 µg/Kg perfazendo uma concentração final teórica de 220 µg/Kg.

2.3 – Bioacessibilidade da patulina

Neste estudo foi testado o método digestivo *in vitro* que simula as condições fisiológicas de digestão em adultos, previamente estabelecidas por Versantvoort e colaboradores (2005) (Versantvoort et al., 2005) e usadas no DAN (Zeila, 2011).

2.3.1- Reagentes e soluções

Para a preparação dos sucos digestivos foram adquiridos os seguintes reagentes: cloreto de potássio (KCl), tiocianato de potássio (KSCN), dihidrogenofosfato de sódio anidro ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), cloreto de sódio (NaCl), hidrogenocarbonato de sódio (NaHCO_3), p.a., cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), cloreto de amónia (NH_4Cl), hidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4), cloreto de magnésio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), ureia, ácido clorídrico (HCl) 37%, pepsina, pancreatina, albumina de soro bovina e D(+) Glucose anidro, todos adquiridos na Merck (VWR, Portugal). Alfa-amilase de *Bacillus* sp., lípase de pâncreas suíno e a biliar através da Sigma-Aldrich (Dias de Sousa, Portugal) e mucina e ácido úrico respetivamente através da Carol Rith GmbH (BetaLab, Portugal) e BDH Prolabo (VWR, Portugal).

Soluções gerais

- ◆ Bicarbonato, NaHCO_3 (1 M): 8,4 g de NaHCO_3 foram diluídos em água ultrapura, perfazendo o volume até 100 mL.
- ◆ Hidróxido de Sódio, NaOH (1 M e 10 M): 40 g de NaOH foram diluídos em água ultrapura, perfazendo o volume até 100 mL, obtendo a concentração de 10 M. A solução a 10 M foi diluída de 1:10 em água ultrapura para obter a concentração de 1 M.

Preparação dos sucos

Os sucos digestivos foram preparados de acordo com os volumes e as quantidades representadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Composição, volume final dos sucos digestivos e quantidade de reagentes utilizadas (mg) nos modelos de digestão *in vitro* em adulto e infantil (adaptado de Versantvoort et al. 2005 e Raiola et al. 2012b)

Sucos Volume	Saliva	Gástrico		Duodenal		Biliar	
	250 mL	500 mL		500 mL		250 mL	
	Adulto/ Criança	Adulto	Criança	Adulto	Criança	Adulto	Criança
Fase Inorgânica	74,5 mg NaCl	1376 mg NaCl		3506 mg NaCl		1315 mg NaCl	
	224 mg KCl	412 mg KCl		282 mg KCl		94 mg KCl	
	423,5 mg NaHCO ₃	153 mg NH ₄ Cl		1694 mg NaHCO ₃		1446 mg NaHCO ₃	
	255,25 mg NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	153 mg NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O		40 mg KH ₂ PO ₄		37,5 µl HCl 37%	
	142,5 mg Na ₂ SO ₄	153 mg CaCl ₂ .2H ₂ O		25 mg MgCl ₂ .6H ₂ O		-	
	50 mg KSCN	3,25 mL HCl 37%		-		-	
Fase Orgânica	50 mg Ureia	42,5 mg Ureia		50 mg Ureia		63 mg Ureia	
	-	325 mg Glucose		-		-	
	-	10 mg Ácido Glucorónico		-		-	
	-	165 mg D(+)-Glucoseamina		-		-	
Substâncias Adicionais	72,5 mg α-amilase*	500 mg BSA**		500 mg BSA**		450 mg BSA**	
	3,75 mg Ácido úrico	1250 mg Pepsina**	20 mg Pepsina**	4500 mg Pancreatina	0,5 mg Pancreatina	55,5 mg CaCl ₂ .2H ₂ O	
	6,3 mg Mucina**	1500 mg Mucina**		800 mg Lipase**		7500 mg BÍlis	181,82 mg BÍlis
	-	-	-	100 mg CaCl ₂ .2H ₂ O		-	-
pH	6,5 ± 0,2	1,3 ± 0,1	3 ± 0,1	8,1 ± 0,2		8,2 ± 0,2	

Depois de preparados, os sucos foram mantidos a 37°C até à sua utilização nos ensaios de digestão.

2.3.2 – Digestão *in vitro*

Controlos

Previamente ao processo de digestão foram realizados tubos controlo para o pH, de modo a conferir se as amostras foram digeridas na gama de pH pretendido: em dois tubos adicionou-se respetivamente 1 mL de saliva + 2 mL de suco gástrico (valor de pH entre 2,5 ± 0,5 para a fase gástrica) e 1 mL de saliva + 2 mL de suco gástrico + 2 mL de suco duodenal + 1mL de bÍlis + 333 µl de solução NaHCO₃ (valor de pH entre 6,5 ± 0,5 para a fase duodenal).

Digestão in vitro

Para cada replicado de amostra de alimento infantil foram pesados 4,5 g. No caso dos sumos acompanhados de refeição padrão pesaram-se 4,5 g de sumo + 4,5 g de refeição. A cada um destes replicados foram adicionados 6 mL de saliva, seguindo-se uma incubação de 5 min a 37°C com agitação. Posteriormente, adiciona-se 12 mL de suco gástrico a cada replicado e o valor do pH foi registados e acertado quando necessário (adulto: pH $2,5 \pm 0,5$; criança: pH $3,5 \pm 0,5$). Seguiu-se uma incubação durante 2 horas a 37°C com agitação. Após as 2 horas de incubação, o valor do pH foi novamente registado. Para finalizar a digestão foram adicionados 12 mL de suco duodenal, 6 mL de suco biliar e 2 mL de solução de bicarbonato a replicado. O valor de pH foi novamente registado e acertado quando necessário ($6,5 \pm 0,5$), seguindo-se uma nova incubação de 2 horas a 37°C com agitação. Decorridas as 2 horas, o valor do pH voltou a ser registado. Terminada a digestão, todos os replicados das amostras foram centrifugados a 2750 rpm durante 5 min. Os sobrenadantes foram recolhidos e mantidos a -20°C até à extração e quantificação, Figura 2 (Introdução).

2.3.3- Bioacessibilidade da patulina em sumos

Foram realizados inicialmente vários ensaios para descartar a eventualidade de interferência de fatores que pudessem mascarar/interferir com os valores reais de bioacessibilidade em sumos como a estabilidade da micotoxina, o método de extração utilizado (avaliado através da recuperação) e a variabilidade da própria amostra no dia e em dias diferentes de análise. Estes valores serviram de base para a comparação com os valores de bioacessibilidade obtidos em amostras de sumos fortificados com refeição, simulando a ingestão de uma refeição com sólidos e líquidos, habitual na dieta das crianças.

Estabilidade da patulina a -20°C

Para estudar a estabilidade da patulina a -20°C foram descongeladas quatro amostras (8 Frutos, Tropical, Maçã e Maçã-Cenoura) e determinada a sua concentração por HPLC-UV (n=4). Após um período de 3 meses da contaminação inicial, foram retiradas alíquotas em duplicado, de cada amostra, ao longo de 3 etapas: etapa 1- momento da contaminação, etapa 2- 1 mês após a contaminação e etapa 3 - 3 meses após contaminação com patulina.

Extração e recuperação da patulina

Para determinar a eventual influência do método de extração nos valores de bioacessibilidade, foi analisada a recuperação de patulina em duas amostras de sumos contaminadas (n=2), escolhidas aleatoriamente, e de natureza diferente (8 Frutos - turvo e Maçã - límpido). Para além do método de extração usual, foi efetuada uma extração adicional com clarificação prévia com pectinase (seguida de extração por SPE). Cada amostra foi analisada em duplicado. Foram ainda analisados os valores de recuperação antes e depois da digestão das amostras para testar se a digestão pode só por si provocar alterações na natureza dos sumos afetando a extração e consequentemente, a biodisponibilidade.

Variabilidade da bioacessibilidade da patulina em amostras de sumo

Para avaliar a variabilidade da bioacessibilidade da patulina na matriz sumos atribuída ao dia de análise (variação intra-dia) e entre dias (variação inter-dias, identificada por dia 1 e dia 2) foram analisados os teores de patulina em 4 amostras de sumos (8 frutos e Tropical - turvos e Maçã e Maçã-Cenoura - límpidos-) analisados no mesmo dia e em dois dias diferentes, não consecutivos (espaçados um mês), e em triplicado por forma a obter uma quantidade amostral mais significativa (n=4).

2.3.4- Análise do efeito da matriz alimentar na bioacessibilidade de patulina

Foram estudadas três matrizes sólidas diferentes: esparguete à bolonhesa, guisado de borrego e bolacha maria, três alimentos consumidos pelas crianças portuguesas, com o objetivo de estudar a ação do tipo de refeição na bioacessibilidade de patulina em sumos. Para cada sumo analisado (6 para o esparguete e 4 para as restantes, conforme atrás referido), foi efetuado um ensaio na presença e ausência de refeição, e duplicados para cada amostra.

2.3.5- Estudo comparativo da digestão com os modelos *in vitro* de adulto e infantil

As condições usadas na digestão *in vitro* para crianças foram as mesmas usadas para a digestão adulto com ligeiras modificações descritas por Raiola e colaboradores (2012b) relativamente aos valores de pH na fase gástrica (2 no adulto para 3 no infantil) e ainda nas quantidades dos reagentes: pepsina (0,5 g no adulto para 0,02 g no infantil), pancreatina (4,5 g no adulto para 0,0005 g no infantil) e sais biliares (1237,5 g no adulto para 0,03 g no infantil) que se encontram descritas na Tabela 6. Cada amostra de sumo

(no total de 4, conforme atrás referido) foi analisada na presença e ausência de refeição (guisado de borrego) e em triplicado, o que perfaz um total de 48 análises (24 para o modelo adulto e 24 para o modelo infantil) (n=4).

2.4- Determinação da bioacessibilidade e análise estatística dos resultados

A determinação da bioacessibilidade (porção do contaminante que se liberta da matriz alimentar por ação do suco digestivo no trato gastrointestinal), foi expressa em percentagem e determinada pela fórmula:

$$Bioacessibilidade = \frac{\left\{ C_{dig} \left(\frac{\mu g}{Kg} \right) * \frac{[Qm(g) + Qr(g) + Qs(mL) + 18]}{Qm(g)} * 100 \right\}}{Ct_{matriz} \left(\frac{\mu g}{Kg} \right)}$$

Onde:

Qm: Quantidade na matriz (g)

Qr: Quantidade de refeição padrão (g)

Qs: Quantidade de soluções de HCl ou NaOH adicionadas nos acertos de pH (mL)

C dig: Concentração do contaminante no digerido ($\mu g/Kg$)

Ct matriz: concentração total inicial do contaminante na matriz ($\mu g/Kg$)

Os resultados obtidos foram analisados com recurso ao programa SPSS- *Statistical Package for Social Sciences*- o qual permitiu realizar a análise da estatística descritiva que descreve características importantes de dados amostrais conhecidos e realizar uma análise inferencial que permite tirar generalizações/conclusões sobre uma população usando informações de uma amostra: os testes de normalidade (Shapiro-Wilk), homogeneidade de variâncias (Levene), comparação entre grupos (t-student, Mann-Whitney) e ainda o teste não-paramétrico para amostras com distribuição não normal (Kuskal-Wallis).

3- Resultados

3.1 – Estudo da bioacessibilidade de patulina em sumos

3.1.1 – Estabilidade da patulina a -20°C

Na Tabela 7 apresentam-se os teores médios de patulina determinados em sumos contaminados artificialmente (para um teor final de 200 µg/Kg), mantidos a -20°C por um período de 3 meses. As quatro amostras analisadas revelaram teores de patulina situados entre 105 e 144 µg/Kg após um e três meses de contaminação. Dado que não foi analisada a concentração inicial do sumo, somente se pode referir que não ocorreram alterações de realce entre um e três meses de contaminação, pelo que se garante que a patulina se mantém estável nos sumos contaminados durante este período.

Tabela 7 – Contaminação média de patulina em sumos contaminados artificialmente, mantidos a -20°C ao longo de três meses (contaminação média expressa em µg/Kg, n=4, ensaios em duplicado).

Amostra	Contaminação inicial teórica (µg/kg)	Concentração média (µg/kg)		
	Etapas 1*	Etapas 2 *	Etapas 3*	
8 Frutos	200,00	110,92	114,86	
Tropical	200,00	105,55	111,53	
Maçã	200,00	120,48	127,24	
Maçã-Cenoura	200,00	143,73	144,20	

* Etapas de contaminação: etapa 1 - contaminação inicial teórica, etapa 2 – após um mês de contaminação e etapa 3 – após 3 meses de contaminação

3.1.2 – Recuperação da patulina - extração e digestão *in vitro*

Na Tabela 8 são apresentados os valores médios de recuperação (%) de patulina em duas amostras de sumos (n=2), com recurso ao método de extração normal por SPE e com adição prévia de pectinase e extração SPE (P+SPE). No sumo turvo, a recuperação média com SPE é superior ao da extração com P+SPE (84% vs 42%) embora com uma grande variação entre duplicados. No sumo límpido, as recuperações são semelhantes com os dois métodos de extração (58% vs 54%), no entanto, a variação é menor.

Tabela 8 – Valores médios de recuperação (%) da patulina em amostras de sumo usando a extração com SPE e pectinase e SPE (P+SPE) (n=2, ensaios em duplicado). DP: Desvio Padrão.

Amostra	Tipo Extração	Recuperação (%)	
		%	Média ± DP
8 Frutos	SPE	98	84 ± 19,80
	SPE	70	
	P+SPE	36	42 ± 8,49
	P+SPE	48	
Maçã	SPE	59	58 ± 2,12
	SPE	56	
	P+SPE	64	54 ± 14,14
	P+SPE	44	

Usando o método de SPE como extração foi analisado o eventual efeito do próprio método de digestão *in vitro* na recuperação da patulina. Na Tabela 9 apresentam-se os valores médios de recuperação de patulina em amostras de sumo antes (AnD) e após a digestão (ApD) pelo método de digestão *in vitro*, segundo as condições descritas para o adulto para as amostras 8 Frutos e Maçã. Para o sumo 8 Frutos obteve-se uma recuperação média de 64% antes da digestão e 84% após da digestão. Para o sumo Maçã, obteve-se uma recuperação média de 47% antes da digestão e 58% após da digestão. Em ambas as amostras as recuperações foram superiores após a digestão (84% vs 58%)

Tabela 9 - Valores médios de recuperação (%) da patulina em amostras de sumo antes digestão (AnD) e após digestão (ApD) pelo método de digestão *in vitro* para adulto (n=2, duplicados). DP: Desvio Padrão.

Amostra	Digestão	Recuperação	
		%	Média \pm DP
8 Frutos	AnD	68	68 \pm 0
		-	
	ApD	98	84 \pm 19,80
		70	
Maçã	AnD	47	47 \pm 33,23
		0	
	ApD	59	58 \pm 2,12
		56	

3.1.3- Variabilidade da bioacessibilidade da patulina

A Tabela 10 apresenta os resultados para os valores de bioacessibilidade para as quatro amostras, analisadas em triplicado, em dois dias diferentes (Dia 1 e Dia 2). Verifica-se que no Dia 1, as amostras analisadas apresentam valores médios de bioacessibilidade semelhantes, variando entre 18,52% \pm 14,91 (Maçã-Cenoura), 21,09% \pm 5,99 (8 Frutos), 21,86% \pm 4,25 (Tropical) e 24,15% \pm 1,85 (Maçã).

No dia seguinte, Dia 2, os valores médios de bioacessibilidade obtidos variam entre 10,66% \pm 6,27 (Tropical), 14,55% \pm 12,29 (8 Frutos), 16,32% \pm 3,19 (Maçã-Cenoura) e 16,87 \pm 6,81 (Maçã), apresentando valores médios semelhantes entre si. Comparando ambos os dias, verifica-se que no Dia 2 os valores são ligeiramente inferiores aos obtidos no Dia 1, para qualquer amostra analisada.

Tabela 10 - Bioacessibilidade da patulina em sumos analisados em dois dias diferentes e análise descritiva dos resultados (n=4). DP: Desvio Padrão.

Tipo de Amostra		Bioacessibilidade	
		(%)	Média ± DP
Dia 1	8 Frutos	23,38	21,09 ± 5,99
		25,60	
		14,29	
	Tropical	17,65	21,86 ± 4,25
		24,92	
		23,65	
	Maçã	22,20	24,15 ± 1,85
		25,89	
		24,36	
	Maçã-Cenoura	1,31	18,52 ± 14,91
		27,66	
		26,59	
Dia 2	8 Frutos	24,75	14,55 ± 12,29
		0,900	
		18,19	
	Tropical	14,05	10,66 ± 6,27
		14,50	
		3,420	
	Maçã	23,04	16,87 ± 6,81
		18,85	
		9,57	
	Maçã-Cenoura	14,54	16,32 ± 3,19
		14,42	
		20,35	

Para a avaliação da normalidade dos valores de bioacessibilidade obtidos para as quatro amostras analisadas, tendo em conta o n=3 (triplicado dos ensaios), foi usado o teste de Shapiro-Wilk. Para o primeiro dia (Dia 1) obtém-se $p > 0,05$ para todos os grupos, logo é aceite o pressuposto de normalidade da variável numérica (8 Frutos com 0,36; Tropical com 0,29; Maçã com 0,81 e Maçã-Cenoura com 0,07).

Sendo normal, já se pode aplicar os testes paramétricos para avaliar se existe uma variação entre os valores do próprio dia. Para a avaliação da homogeneidade das variâncias das bioacessibilidades das amostras no Dia 1, usa-se o teste de Levene no qual se obtém um valor de 0,012. Como p valor $< 0,05$, não se verifica a homogeneidade de variâncias enquanto pressuposto para aplicação de teste de ANOVA. Assim sendo, é efetuado um teste não paramétrico de Kruskal Wallis, no qual se obtém um valor de

0,789. Atendendo a que p valor $> 0,05$ considera-se que não existem evidências estatisticamente significativas das diferenças verificadas para as médias de bioacessibilidade dos diferentes grupos de sumos no Dia 1.

Para o segundo dia (Dia 2) de avaliação de bioacessibilidade, não se verifica em todos os grupos que o p valor $> 0,05$ – assim não é aceite o pressuposto de normalidade da variável numérica (8 Frutos com 0,53; Tropical com 0,07; Maçã com 0,72 e Maçã-Cenoura com 0,04). Para a avaliação da homogeneidade das variâncias das bioacessibilidades das amostras no Dia 2, usa-se o teste de Levene, no qual se obtém um valor de 0,012. Como p valor $< 0,05$ - não se verifica a homogeneidade de variâncias enquanto pressuposto para aplicação de teste de ANOVA. Assim sendo, é efetuado um teste não paramétrico de Kruskal Wallis no qual se obtém um valor de 0,584. Atendendo a que p valor $> 0,05$ considera-se que não existem evidências estatisticamente significativas das diferenças verificadas para as médias de bioacessibilidade dos diferentes grupos de sumos.

Em suma, não se registam diferenças significativas para a bioacessibilidade da patulina em sumos, com exceção da amostra de Maçã-Cenoura (p valor $< 0,05$), em que pode existir variação dos valores dentro da mesma amostra.

3.2 – Análise do efeito da matriz alimentar na bioacessibilidade de patulina

3.2.1 – Bolonhesa

Os resultados de bioacessibilidade obtidos para os seis sumos analisados (3 límpidos e 3 turvos) na presença e ausência de bolonhesa são apresentados na Tabela 11.

Relativamente à natureza dos sumos os resultados são de seguida referidos. Para os sumos turvos, verificou-se que os valores de bioacessibilidade na ausência de refeição, variaram entre 15,78 e 48,52% com uma média de $27,77\% \pm 16,03$. Os valores de bioacessibilidade para os mesmos sumos, na presença de refeição, variaram entre 1,67 e 15,11% com um valor médio de $9,82\% \pm 5,03$. Quando comparados os resultados de sumos turvos na ausência e presença de refeição, verifica-se que os valores de bioacessibilidade média para as amostras digeridas na ausência de refeição (27,77 %) apresentam um valor mais elevado que as mesmas amostras na presença de refeição (9,82%).

Para os sumos límpidos, a bioacessibilidade na ausência de refeição varia entre 19,52% e 48,14%, com uma média de $31,68\% \pm 11,87$. Na presença de refeição, as mesmas amostras variam entre 4,58% e 8,22%, apresentando uma média de $5,46\% \pm 1,38$. Quando comparados os valores médios de bioacessibilidade para os sumos límpidos na presença (5,46%) e ausência (31,68%) de refeição verifica-se que são diferentes.

A média dos valores de bioacessibilidade na ausência de refeição para os sumos límpidos (31,68%) é superior e não estatisticamente significativa (p valor = 0,088; p valor > 0,05) que os sumos turvos (27,77%). Pelo contrário, na presença de refeição, a media para os valores de bioacessibilidade dos sumos límpidos (5,46%) foi inferior e não estatisticamente significativa (p valor = 0,093; p valor > 0,05) que os sumos turvos (9,82%).

Relativamente à presença e ausência de refeição, os resultados evidenciam que existe uma variação significativa (p valor = 0,001; p valor < 0,05) relativa à ausência (29,72%) e presença (7,64%) de refeição, independente da natureza do sumo.

Tabela 11 –Bioacessibilidade de patulina (%) em 6 sumos de fruta na ausência e presença de refeição bolonhesa(n=6). DP: Desvio Padrão.

Amostra	Natureza	Bioacessibilidade (%) sem refeição	Média ± DP	Bioacessibilidade (%) com refeição	Média ± DP
Frutos Variados	Turvos	18,08	18,82 ± 1,04	13,34	13,08 ± 0,37
		19,55		12,81	
16,41		16,10 ± 0,45	15,11	8,39 ± 9,50	
15,78			1,67		
Multifrutos 1		48,52	48,39 ± 0,19	9,41	7,99 ± 2,00
		48,25		6,58	
Multifrutos 2					
			27,77 ± 16,03		9,82 ± 5,03
100% Maça equilíbrio	Límpido	21,97	20,75 ± 1,73	4,64	4,79 ± 0,21
		19,52		4,94	
28,39		27,98 ± 0,59	5,24	4,91 ± 0,47	
27,56			4,58		
Cocktail Jr		44,46	46,30 ± 2,60	5,14	6,68 ± 2,18
		48,14		8,22	
			31,68 ±11,87		5,46 ± 1,38
Total			29,72 ±13,60*		7,64 ±4,19*

* Significância estatística obtida através do teste de Mann-Whitney com p valor <0.05, comparando a bioacessibilidade de patulina na ausência e na presença de refeição padrão.

3.2.2 – Guisado de Borrego

Na Tabela 12 apresentam-se os resultados obtidos para a bioacessibilidade de patulina nas quatro amostras: 8 Frutos, Tropical, Maça e Maça-cenoura.

Para os sumos turvos (8 Frutos e Tropical), verificou-se que os valores de bioacessibilidade na ausência de refeição, variaram entre 12,21 e 17,57% com uma média de 21,58% ± 4,55. Os valores de bioacessibilidade para os mesmos sumos, na presença de refeição, variaram entre 12,21 e 17,57% com um valor médio de 15,00% ± 5,03. Quando comparados os resultados de sumos turvos na ausência e presença de refeição, verifica-se que os valores de bioacessibilidade média para as amostras

digeridas na ausência de refeição (21,58 %) apresentam um valor mais elevado que as mesmas amostras na presença de refeição (15,00 %).

Para os sumos límpidos (Maçã e Maçã-Cenoura), a bioacessibilidade na ausência de refeição varia entre 22,20% e 27,66%, com uma média de $25,34 \pm 2,13$. Na presença de refeição, as mesmas amostras variam entre 4,48% e 22,79%, apresentando uma média de $17,91\% \pm 6,79$. Quando comparados os valores médios de bioacessibilidade para os sumos límpidos na presença (17,91%) e ausência (25,34%) de refeição verifica-se que são diferentes sendo os valores de bioacessibilidade superiores na ausência de refeição.

Na presença de refeição, obteve-se para as quatro amostras analisadas um valor médio de $16,45\% \pm 5,03$; inferior ao obtido nas mesmas amostras na ausência de refeição, $23,29\% \pm 4,00$.

Tabela 12 - Bioacessibilidade para os diferentes sumos na presença de refeição guisado de borrego (n=4). DP: Desvio Padrão.

Amostra	Natureza	Bioacessibilidade (%) sem refeição	Média ± DP	Bioacessibilidade (%) com refeição	Média ± DP
8 Frutos	Turvos	23,38	21,09 ± 5,99	16,31	15,94 ± 1,84
		25,60		17,57	
		14,29		13,94	
Tropical		17,65	22,07 ± 3,88	12,21	14,05 ± 2,27
		24,92		16,59	
		23,65		13,36	
			21,58 ± 4,55		15,00 ± 2,12
Maçã	Límpido	22,20	24,15 ±1,85	18,34	20,22 ± 1,96
		25,89		22,25	
		24,36		20,07	
Maçã-Cenoura		-	27,13 ± 0,76	19,52	15,60 ± 9,77
		27,66		22,79	
		26,59		4,48	
			25,34 ± 2,13		17,91 ± 6,79
Total			23,29 ± 4,00		16,45 ± 5,03

3.2.3 – Bolacha Maria

Na Tabela 13 apresentam-se os resultados obtidos para a bioacessibilidade de patulina nas quatro amostras: 8 Frutos, Tropical, Maçã e Maçã-Cenoura.

Para os sumos turvos (8 Frutos e Tropical), verificou-se que os valores de bioacessibilidade na ausência de refeição, variaram entre 3,42 e 24,75% com uma média de $14,98\% \pm 7,75$. Os valores de bioacessibilidade para os mesmos sumos, na presença de refeição, variaram entre 5,21 e 12,16% com um valor médio de $8,88\% \pm 2,67$. Quando comparados os resultados de sumos turvos na ausência e presença de refeição, verifica-se que os valores de bioacessibilidade média para as amostras digeridas na ausência de refeição (14,98%) apresentam um valor mais elevado que as mesmas amostras na presença de refeição (8,88%).

Para os sumos límpidos (Maçã e Maçã-Cenoura), a bioacessibilidade na ausência de refeição varia entre 9,57 e 23,04%, com uma média de $16,80\% \pm 4,87$. Na presença de refeição, as mesmas amostras variam entre 8,92 e 85,95% apresentando uma média de $25,64\% \pm 33,75$. Quando comparados os valores médios de bioacessibilidade para os sumos límpidos na presença (25,64%) e ausência (16,80%) de refeição verifica-se que são diferentes sendo os valores de bioacessibilidade inferiores na ausência de refeição.

Na presença de refeição, obteve-se para as quatro amostras analisadas um valor médio de $16,50\% \pm 23,15$ e para a ausência de refeição um valor médio semelhante de $15,97\% \pm 6,07$.

Tabela 13 - Bioacessibilidade para os diferentes sumos na presença de refeição bolacha maria (n=4). DP: Desvio Padrão.

Amostra	Natureza	Bioacessibilidade (%) sem refeição	Média ± DP	Bioacessibilidade (%) com refeição	Média ± DP
8 Frutos	Turvos	24,75	21,47 ± 4,64	12,16	9,09 ± 3,54
		-		5,21	
		18,19		9,89	
Tropical		14,05	10,66 ± 6,27	9,91	8,68 ±2,28
		14,50		6,05	
		3,42		10,08	
			14,98 ± 7,75		8,88 ± 2,67
Maçã	Límpido	23,04	17,15 ± 6,89	-	11,46 ± 2,13
		18,85		9,95	
		9,57		12,96	
Maçã-Cenoura		14,54	16,44 ± 3,39	10,42	35,10 ± 44,05
		14,42		85,95	
		20,35		8,92	
			16,80 ± 4,87		25,64 ± 33,75
Total			15,97 ± 6,07		16,50 ± 23,15

Diferenças entre amostras e comparação entre refeições

Foi avaliada as diferenças nos valores de bioacessibilidade para os diferentes tipos de amostras (diferentes sumos). Para isto, tendo em conta que temos uma variável categórica com 4 categorias (8 Frutos, Tropical, Maçã, Maçã-Cenoura) e os resultados de bioacessibilidade, avaliou-se a normalidade da variável numérica (teste de Shapiro-Wilk), e a homogeneidade de variâncias através do teste de Levene, no qual se obteve um valor de 0,069. Apesar de se verificar o pressuposto da homogeneidade de variâncias (teste de Levene com p valor $> 0,05$) não se verifica que todos os valores de bioacessibilidade apresentam normalidade (8 Frutos com 0,524, Tropical com 0,966, Maçã com 0,784 e Maçã-Cenoura com 0,00) sendo que para o grupo Maçã-Cenoura p valor $< 0,05$, não estando assim reunidos os pressupostos para aplicação do teste de ANOVA, optando-se pelo teste não paramétrico Kuskal-Wallis com o qual se obtém um valor de 0,992. Como p valor $> 0,05$; verifica-se assim que não há evidências estatísticas quanto a uma diferença significativa nos resultados de bioacessibilidade apresentados pelos 4 grupos de amostras.

Após esta análise, avaliou-se para cada grupo de amostra as diferenças, tendo em conta as diferentes refeições (Guisado de Borrego e Bolacha Maria). Para isto, tendo em conta que temos uma variável categórica com 2 categorias (Guisado de Borrego, Bolacha Maria) e os resultados de bioacessibilidade, avaliou-se a homogeneidade de variâncias (teste de Levene) e normalidade da variável numérica (teste de Shapiro-Wilk), enquanto pressupostos para aplicação do teste de ANOVA. A refeição, Esparguete à Bolonhesa não foi considerada nesta análise por apenas dispor de dois valores para análise por amostra.

8 Frutos

Relativamente à normalidade, usando o teste de Shapiro-Wilk, verifica-se que os valores de bioacessibilidade apresentam normalidade para os grupos Guisado de Borrego com o valor de 0,666 e Bolacha Maria com o valor de 0,623 (p valor $> 0,05$). Para avaliação da homogeneidade de variâncias, efetuou-se o teste de Levene, apenas para os grupos Bolacha Maria e Guisado de Borrego. Verificou-se homogeneidade de variâncias 0,297 (p valor $> 0,05$). Assim, para as refeições Guisado de Borrego e Bolacha Maria verificam-se os pressupostos para aplicação do teste T-Student, com o qual se obtém o valor de 0,041 (p valor $< 0,05$).

Verifica-se assim que há evidências estatísticas quanto a uma diferença significativa nos resultados de bioacessibilidade apresentados no sumo "8 Frutos" quando adicionado de Guisado de Borrego ou Bolacha Maria.

Tropical

Verifica-se com o teste Shapiro-Wilk que os resultados de bioacessibilidade apresentam uma distribuição normal, 0,489 (p valor $> 0,05$) para o sumo Tropical com adição de refeição Guisado de borrego e 0,071 (p valor $> 0,05$) com adição de refeição Bolacha maria. Quanto à homogeneidade de variâncias, usando-se o teste de Levene, verifica-se que apresentam homogeneidade de variâncias com o valor de 0,933 (p valor $> 0,05$). Logo, estão reunidos os pressupostos para aplicação de teste T-Student, com o qual se obtém o valor de 0,044 (p valor $< 0,05$).

Verifica-se assim que há evidências estatísticas quanto a uma diferença significativa nos resultados de bioacessibilidade apresentados nos sumos "Tropical"

quando adicionadas refeições de Guisado de Borrego ou Bolacha Maria (p valor $< 0,05$).

Maçã

Relativamente à normalidade, usando o teste de Shapiro-Wilk, verifica-se que os valores de bioacessibilidade apresentam normalidade para os grupos Guisado de Borrego com o valor de 0,873 e Bolacha Maria com o valor de 0,427 (p valor $> 0,05$). Quanto à homogeneidade de variâncias, usando-se o teste de Levene, verifica-se que apresentam homogeneidade de variâncias com valor de 0,087 (p valor $> 0,05$). Logo, estão reunidos os pressupostos para aplicação de teste T-Student com o qual se obtém o valor de 0,037 (p valor $< 0,05$).

Verifica-se assim que há evidências estatísticas quanto a uma diferença significativa nos resultados de bioacessibilidade apresentados nos sumos "Maçã" quando adicionados de Guisado de Borrego ou Bolacha Maria (p valor $< 0,05$).

Maçã-Cenoura

Relativamente à normalidade, usando o teste de Shapiro-Wilk, verifica-se que os valores de bioacessibilidade não apresentam normalidade para os dois grupos Guisado de Borrego com o valor de 0,321 e Bolacha Maria com o valor de 0,033 (p valor $< 0,05$ no caso do grupo da Bolacha Maria). Quanto à homogeneidade de variâncias, usando-se o teste de Levene, verifica-se que não apresentam homogeneidade de variâncias com valor de 0,039 (p valor $< 0,05$). Logo, não estão reunidos os pressupostos para aplicação de teste T-Student. Utiliza-se o teste de Mann Whitney com o qual se obtém o valor de 0,827 (p valor $> 0,05$).

Verifica-se assim que não há evidências estatísticas quanto a uma diferença significativa nos resultados de bioacessibilidade apresentados nos sumos "Maçã-Cenoura" quando adicionados de Guisado de Borrego ou Bolacha Maria (p valor $> 0,05$).

Conclui-se assim que, à exceção da amostra Maçã-Cenoura, existem diferenças estatisticamente significativas para os valores de bioacessibilidade de patulina em relação ao tipo de refeição utilizado, sendo o Guisado de Borrego a refeição onde se obtém valores de bioacessibilidade superiores ao invés da Bolacha Maria onde os valores são inferiores.

3.3- Estudo comparativo da digestão com os modelos *in vitro* de adulto e infantil

Na Tabela 14 apresentam-se os resultados para os valores de bioacessibilidade obtidos com o modelo de digestão *in vitro* de Adulto e Infantil na ausência de refeição. Como é possível verificar o valor médio obtido para cada uma das amostras analisadas foi no modelo Adulto na ausência de refeição foi de $21,09\% \pm 5,99$ no sumo 8 Frutos com valores de bioacessibilidade entre 14,29 e 25,60%, $22,07\% \pm 3,88$ no Tropical com valores entre 17,65 e 24,92%, $24,15\% \pm 1,85$ no sumo Maçã com valores entre 22,20 e 25,89% e $18,52\% \pm 14,91$ no sumo Maçã-Cenoura com valores entre 1,31 e 27,66%.

Para o modelo de digestão Infantil com as mesmas amostras e nas mesmas condições de ausência de refeição, os valores médios de bioacessibilidade obtidos foram de $5,83\% \pm 0,63$ no sumo 8 Frutos com valores entre 5,13 e 6,34%, $5,42\% \pm 0,08$ no Tropical com valores entre 5,38 e 5,51%, $7,11\% \pm 0,85$ no sumo Maçã com valores entre 6,37 e 8,03% e $7,65\% \pm 0,55$ no sumo Maçã-Cenoura com valores entre 7,05 e 8,14%.

Os valores médios de bioacessibilidade foram superiores quando utilizado o modelo de digestão *in vitro* para Adulto na ausência de refeição para as quatro amostras (8 Frutos, Tropical, Maçã e Maçã-Cenoura), (21,46%) quando comparado nas mesmas condições com o modelo de digestão *in vitro* Infantil (6,50%).

Não se verificam diferenças nos valores médios de bioacessibilidade relacionados com a natureza dos sumos. No modelo de digestão Adulto os sumos turvos apresentam um valor médio semelhante aos límpidos (21,58 e 21,34% respetivamente) como acontece com o modelo de digestão Infantil, onde os sumos turvos e límpidos voltam a ter resultados médios semelhantes (5,63 e 7,38% respetivamente).

Tabela 14 - Bioacessibilidade de patulina em amostras de sumo (8 Frutos, Tropical, Maçã e Maçã-Cenoura) na ausência de refeição com recurso a dois modelos de digestão *in vitro*, Adulto e Infantil (n=4). DP: Desvio Padrão.

Adulto				Infantil	
Amostra	Natureza	Bioacessibilidade (%) sem refeição	Média ± DP	Bioacessibilidade (%) sem refeição	Média ± DP
8 Frutos	Turvos	23,38	21,09 ± 5,99	5,13	5,83 ± 0,63
		25,60		6,34	
		14,29		6,01	
Tropical		17,65	22,07 ± 3,88	5,38	5,42 ±0,08
		24,92		5,38	
		23,65		5,51	
			21,58 ± 4,55		5,63 ± 0,46
Maçã	Límpido	22,20	24,15 ± 1,85	6,37	7,11 ± 0,85
		25,89		8,03	
		24,36		6,92	
Maçã-Cenoura		1,31	18,52 ± 14,91	8,14	7,65 ±0,55
		27,66		7,05	
		26,59		7,77	
			21,34 ± 9,99		7,38 ± 0,71
Total			21,46 ± 7,40		6,50 ± 1,08

Na Tabela 15, apresentam-se os resultados para os valores de bioacessibilidade obtidos com o modelo de digestão *in vitro* de Adulto e Infantil na presença de refeição. Como é possível verificar o valor médio obtido para cada uma das amostras analisadas foi no modelo Adulto na presença de refeição foi de 15,94% ± 1,84 no sumo 8 Frutos com valores de bioacessibilidade entre 13,94 e 17,57%, 14,05% ± 2,27 no Tropical com valores entre 2,08 e 3,93%, 20,22% ± 1,96 no sumo Maçã com valores entre 18,34 e 22,25% e 15,60% ± 9,77 no sumo Maçã-Cenoura com valores entre 4,48 e 22,79%.

Para o modelo de digestão Infantil com as mesmas amostras e nas mesmas condições de ausência de refeição, os valores médios de bioacessibilidade obtidos foram de 3,69% ± 0,52 no sumo 8 Frutos com valores entre 3,24 e 4,26%; 2,96% ± 0,93 no Tropical com valores entre 5,38 e 5,51%, 13,60% ± 2,22 no sumo Maçã com valores entre 11,04 e 15,02% e 10,54% ± 1,16 no sumo Maçã-Cenoura com valores entre 9,48 e 11,78%.

Os valores médios de bioacessibilidade foram superiores quando utilizado o modelo de digestão *in vitro* para Adulto na presença de refeição para as quatro amostras (8 Frutos, Tropical, Maça e Maça-Cenoura), (16,45%) quando comparado nas mesmas condições com o modelo de digestão *in vitro* Infantil (7,70%).

Não se verificam diferenças nos valores médios de bioacessibilidade relacionados com a natureza dos sumos. No modelo de digestão Adulto os sumos turvos apresentam um valor médio semelhante aos límpidos (15,00 e 17,91% respetivamente). Com o modelo de digestão Infantil, os sumos turvos e límpidos apresentam resultados médios ligeiramente diferentes (3,33 e 12,07% respetivamente), apresentando os límpidos valores um pouco superiores. Na presença de refeição no modelo Infantil, a distribuição dos valores de bioacessibilidade no geral é maior quando comparado com as mesmas amostras na ausência de refeição, Tabela 14 e 15.

Tabela 15 - Bioacessibilidade de patulina em amostras de sumo na presença de refeição com recurso a dois modelos de digestão *in vitro*, Adulto e Infantil (n=4). DP: Desvio Padrão.

Amostra	Natureza	Adulto		Infantil	
		Bioacessibilidade (%) com refeição	Média ± DP	Bioacessibilidade (%) com refeição	Média ± DP
8 Frutos	Turvo	16,31	15,94 ± 1,84	4,26	3,69 ± 0,52
		17,57		3,58	
		13,94		3,24	
Tropical		12,21	14,05 ± 2,27	3,93	2,96 ± 0,93
		16,59		2,86	
		13,36		2,08	
		15,00 ± 2,12		3,33 ± 0,78	
Maça	Límpido	18,34	20,22 ± 1,96	11,04	13,60 ± 2,22
		22,25		14,73	
		20,07		15,02	
Maça-Cenoura		19,52	15,60 ± 9,77	11,78	10,54 ± 1,16
		22,79		9,48	
		4,48		10,36	
		17,91 ±6,79		12,07 ± 2,30	
Total		16,45 ± 5,03		7,70 ± 4,85	

Verificou-se então que os valores de bioacessibilidade para o modelo infantil apresentam normalidade, usando o teste de Shapiro-Wilk, tendo os límpidos um valor

de 0,644 e os turvos de 0,135 (p valor $> 0,05$). Relativamente à homogeneidade de variâncias, usando o Teste de Levene, verifica-se que não existe uma homogeneidade de variâncias, valor obtido de 0,018 (p valor $< 0,05$). Usando o teste T-Student assumindo a não homogeneidade das variâncias, obtém-se um valor se 0,000.

Verifica-se assim que há evidências estatísticas quanto a uma diferença significativa nos resultados de bioacessibilidade de criança apresentados nos sumos "Límpidos" e "Turvos" (p valor $< 0,05$).

Na avaliação do efeito que o tipo de modelo de digestão (independentemente da presença ou ausência de refeição), tem no valor de bioacessibilidade obtém-se para o modelo Adulto uma média de $18,96 \pm 6,70\%$ com valores entre 1,31 e 27,66%, enquanto que para o modelo Infantil se obtém um valor médio de $7,10 \pm 3,49\%$ com valores entre 2,08 e 15,02%.

Quanto à normalidade, usando o teste de Shapiro-Wilk, verifica-se que não há normalidade em ambos os grupos, o modelo de digestão de adulto apresenta um valor de 0,042 (p valor $< 0,05$) e o modelo de digestão de criança apresenta um valor de 0,111 (p valor $> 0,05$). Considerando isto, optou-se por fazer um teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com o qual se obteve um valor de 0,000 (p valor $< 0,05$).

Verifica-se assim que há evidências estatísticas quanto a uma diferença significativa nos resultados de bioacessibilidade apresentados nos sumos considerando o modelo "Adulto" versus "Infantil".

4- Discussão e Considerações Finais

No domínio da bioacessibilidade em sumos foram efetuados ensaios de estabilidade de patulina, estudados os possíveis efeitos do método de extração utilizado em sumos antes e após a digestão e ainda a variabilidade das amostras nos ensaios de bioacessibilidade. Quanto á estabilidade, os resultados mostraram que os níveis de patulina nas amostras ao longo do período estudo de três meses conservadas a -20°C se mantiveram constantes, o que está de acordo com o descrito por Barreira, 2009 que estudou a ocorrência de patulina em alimentos destinados à alimentação infantil bem como a sua estabilidade, tendo determinado que os teores de patulina se mantêm constantes quando conservados a uma temperatura de -20°C durante 3 meses.

Com o intuito de determinar a influência do método de extração nos valores de bioacessibilidade de patulina antes e depois da digestão (para testar se a digestão pode só por si provocar alterações na natureza dos sumos que possam afetar extração e consequentemente, a biodisponibilidade) foram analisados dois sumos de fruta. Os resultados revelaram valores de 58 e 84 % para SPE e 42 e 54 % para pectinase e SPE, em ambas as amostras os valores de bioacessibilidade foram inferiores aquando a adição de pectinase. Segundo Sagu et al., 2014 seria expectável verificar no sumo turvo um aumento dos valores da recuperação aquando a adição da enzima pectinase na ausência de refeição, uma vez que foi verificado nesse estudo que a presença deste enzima interage positivamente com um sumo turvo, neste caso sumo de banana, clarificando-o em cerca de 80% e melhorando os valores da extração. Os resultados obtidos poderão ser atribuídos a algum problema de degradação da enzima que poderia não estar nas melhores condições e, deverão por isso, ser efetuados mais ensaios com nova enzima. Quando analisadas as recuperações das mesmas amostras antes e após a digestão, verifica-se que os valores são superiores para os extratos digeridos, o que parece lógico na medida em que o extrato digerido já sofreu ação enzimática dos sucos digestivos. No entanto, serão necessários mais estudos para retirar alguma conclusão sobre os efeitos do método de digestão *in vitro* na recuperação da patulina.

A bioacessibilidade não parece ser afetada pela variabilidade de resultados obtidos no mesmo ou em dias diferentes (p valor=0,584) das amostras para a maioria

dos sumos analisados, com exceção da amostra de Maçã-Cenoura que mostrou variação de valores no próprio dia (p valor= 0,04).

Os estudos comparativos sobre a bioacessibilidade de patulina em amostras de sumo sem e com refeição (esparguete à bolonhesa, guisado de borrego e bolacha maria) revelaram uma influência da natureza da matriz estudada, independente da natureza do sumo. Relativamente ao esparguete á bolonhesa, registou-se uma diferença estatística significativa (p valor =0,001) para os valores de bioacessibilidade na ausência de refeição (29,72%) e presença de refeição (7,64%). Estes resultados foram referenciados no estudo de Assunção e colaboradores, 2014 (Assunção et al., 2014), em que a autora participou. Relativamente ao guisado de borrego, para os valores de bioacessibilidade na ausência de refeição (23,29%) e presença de refeição (16,45%) e comparando com a bolacha maria, o valor obtido para a bioacessibilidade na ausência (15,97%) e presença de refeição (16,50%), ambos afetam significativamente os valores de bioacessibilidade de patulina nos sumos 8 Frutos (p valor= 0,041), Tropical (p valor= 0,044) e Maçã (p valor= 0,037). O sumo Maçã-cenoura foi o único que não apresentou diferenças significativas aquando a adição de uma refeição (p valor= 0,827).

No estudo realizado por Brandon e colaboradores, 2012 (Brandon et al., 2012) foi avaliada a bioacessibilidade de patulina em compota de maçã caseira e outra comercial e ainda fruta destinada á alimentação infantil, utilizando o mesmo modelo de digestão *in vitro* para adultos com a adição de uma refeição padrão, jantar holandês (mistura de alho porro, cogumelos, presunto e cenoura). Este estudo revelou valores de bioacessibilidade entre 55 e 85% em alimentos contaminados, superiores aos determinados nesta dissertação para esparguete à bolonhesa (7,64%), guisado (16,45%) e bolacha maria (16,50%). Brandon também analisou a bioacessibilidade dos produtos de maçã com adição de biscoitos, tendo obtido valores de 30%, superior ao obtido nesta dissertação. O facto dos resultados obtidos serem inferiores em todas as matrizes estudadas aos de Brandon poderá ser atribuído ao estudo ser efetuado em matrizes diferentes. De facto Raiola et al. 2012b, também referiu que a bioacessibilidade de diferentes tipos de massas afetaram a bioacessibilidade de micotoxinas (nomeadamente DON). Os sumos analisados neste trabalho apresentam uma composição de vários frutos e não só de maçã, pelo que a matriz difere podendo ter contribuído para um nível de deteção da bioacessibilidade de patulina inferior. Para além deste fato, a natureza dos sumos também terá a sua influência, sendo que a média dos valores de bioacessibilidade

de patulina obtidos para os sumos límpidos em cada refeição (31,68; 25,34 e 16,80% respetivamente) foram semelhantes aos obtidos em Raiola et al. 2012b para dois sumos de maçã límpidos (29,00 e 25,00%). Para os turvos os valores obtidos são inferiores para as mesmas refeições (27,77, 21,58 e 14,98%) quando comparados com os valores obtidos para dois sumos de maçã com polpa (71 e 67%).

Por fim foram comparados os resultados para a bioacessibilidade de patulina com a utilização de dois modelos de digestão *in vitro* diferentes, um destinado a simular o processo digestivo adulto (baseado no modelo RIVM), e outro infantil (baseado no modelo utilizado por Raiola et al., 2012b). Os valores médios de bioacessibilidade obtidos para a patulina foram de $18,96\% \pm 6,70$ com o modelo de adulto e $7,1\% \pm 3,50$, resultado inferior, para o modelo infantil, apresentando diferenças estatisticamente significantes (p valor $< 0,05$). Estes resultados estão de acordo com o verificado em Raiola et al. (2012b), onde os valores médios de bioacessibilidade de DON com o modelo infantil são inferiores, $1,1\% \pm 0,1$, quando comparados com os valores de adulto, $24,1\% \pm 1,7$. Do ponto de vista toxicológico estes resultados são importantes uma vez que se verifica que cerca de 7,1% de patulina, atinge o intestino sem sofrer alterações, estando disponível a de ser absorvida e exercer os seus efeitos tóxicos no organismo, que no caso de uma criança, atendendo á sua fisionomia, intestino mais curto, e desenvolvimento imunitário mais imaturo, poderão exercer mais danos que num adulto. No entanto, é necessário ter em conta que nos modelos de digestão *in vitro*, alguns fatores podem interagir e afetar a bioacessibilidade dos contaminantes alimentares. A inclusão de uma refeição padrão tem interferência na matriz, dos sumos de fruta conduzindo a um decréscimo nos valores de bioacessibilidade como comprovado neste estudo.

Será importante efetuar mais ensaios com vista a confirmar os resultados encontrados face á sua importância na saúde infantil. Existe muito pouca bibliografia sobre a bioacessibilidade de patulina em alimentos, e esta é escassa usando modelos que simulem a digestão em crianças pelo que este trabalho se apresenta como inovador pretendendo ser um contributo para os estudos na área da segurança alimentar.

5- Referências Bibliográficas

- Alvito P.C. (2014). Alterações do estado de saúde associadas à alimentação, contaminação química- micotoxinas. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Portugal, 26-27.
- Alvito P. C., Almeida C. M., Sizoo E. A. & van Egmond H. P. (2010). Occurrence of Aflatoxins and Ochratoxin A in Baby Foods in Portugal. *Food Analytical Methods* , 3: 22-33.
- Assunção R., Ferreira M., Martins C., Dupont D. & Alvito P. (2014). Applicability of in vitro methods to study patulin bioaccessibility and its effects on intestinal membrane integraty. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 77(14-16): 983-992
- Baert K., De Meulenaer B., Verdonck F., Huybrechts I., De Henauw S., Vanrolleghem P., Debevere J. & Devlieghere F. (2007a). Variability and uncertainty assessment of patulin exposure for preschool children in Flanders. *Food Chemical Toxicology*, 45(9): 1745-51.
- Baert K., De Meulenaer B., Kasase C., Huyghebaert A., Ooghe W. & Devlieghere F. (2007b). Free and bound patulin in cloudy apple juice. *Food Chemistry*; 100(3): 1278-82.
- Baert K., Kamala A., De Meulenaer B., Huybrechts I., De Henauw S. & Devlieghere F. (2005). Exposure assessment of patulin in apple juice for Flemish young children. *Proceedings of the 3rd International Symposium on Applications of Modelling as an Innovative Technology in the Agri-Food Chain*, 674: 389-90.
- Barbé, F., Boirie, Y. & Dupont, D. & Gaudichon, C. (2013). Devenir digestif des matrices laitières : applications aux fractions protéiques. In: Anthony Fardet, Isabelle Souchon, Didier Dupont , dir., Structure des aliments et effets nutritionnels (p. 171-184). *Syntheses*. Versailles, FRA : Éditions Quae. <http://prodinra.inra.fr/record/209257> (acedido em 7/04/14)

Barreira M.J. (2009). Ocorrência de patulina em alimentos destinados a lactentes e crianças jovens: otimização e validação do método de análise por SPE-HPLC-UV. Dissertação de mestrado em Controlo de Qualidade e Toxicologia dos Alimentos. Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, (21-36; 45-58).

Barreira M. J., Alvito P. C. & Almeida C. M. (2010). Occurrence of Patulin in Apple-based-foods in Portugal. *Food Chemistry* , 121: 653-658.

Barug D., Bhatnagar D., van Egmond H., Van der Kamp J., Van Ossenbruggen W., & Visconti A. (2006). Mycotoxins in the contexts of food risk and nutrition issues. In G. Shephard, & W. W. Academic (Ed.), *The Mycotoxin Factbook* (21-32).

Boonzaaijer G., Bobeldijk I. & van Ossenbruggen W. (2005). Analysis of patulin in Dutch food, an evaluation of a SPE based method. *Food Control*; 16(7): 587-91.

Bourlieu C., Ménard O., Bouzerzour K., Mandalari G., Macierzanka A., Mackie A., & Dupont D. (2011). Specificity of infant digestive conditions: some clues for developing relevant in vitro models. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* , 54(11): 1-81.

Brandon E. F. A., Baars A. J., Te Biesebeek J. D., Oomen A. G., Bakker M. I. & De Heer C. (2012). Risk assessment of patulin intake from apple containing products by young children. *World Mycotoxin Journal*, 5(4): 391-403.

Brandon E.F.A., Oomen A.G., Rompelberg C.J.M., Versantvoort C.H.M., Van Engelen J.G.M. & Sips A.J.A.M. (2006). Consumer product *in vitro* digestion model: bioaccessibility of contaminants and its application in risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 44: 161-171.

CAST, Council for Agriculture Science and Technology. (2003). Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. *Task force report* No. 139. CAST, Arnes, IA, USA.

Comissão Europeia (2006a) Jornal Oficial da União Europeia. Regulamento (CE) 1831/2003 da Comissão de 18 de Dezembro de 2003 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes em géneros alimentícios, L1831/24 (2003).

Comissão Europeia (2006b) Jornal Oficial da União Europeia. Regulamento (CE) 401/2006 da Comissão de 23 de Fevereiro de 2006 que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios, L70/30-34 (2006).

EFSA, European Food Safety Authority . (2013).

<http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/mycotoxins.htm> (acedido em 27/11/13)

Etzel R.A. (2006). What the primary care pediatrician should know about syndromes associated with exposure to mycotoxins. *Current Problem Pediatric Adolescent Health Care*, 36: 282-305, DOI:10.1016/j.cppeds.2006.05.003

FDA, U.S. Food and Drug Administration. (2014).

<http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/default.htm>. (acedido em 17/2/14)

FSA, Food Standards Agency. (2010). Mycotoxins: your questions answered.

http://food.gov.uk/policy-advice/mycotoxins/questions/#.UzVhMPI_u50 (acedido em 28/3/14)

FSA, Food Standards Agency. (2014). Policy and advice - Mycotoxin.

http://food.gov.uk/policy-advice/mycotoxins/#.UzVi9fl_u50 (acedido em 28/3/14)

Gil-Izquierdo A., Zafrilla P. & Tomás-Barverán F.A. (2002). An *in vitro* method to simulate phenolic compound release from the food matrix into the gastrointestinal tract. *European Food research and technology* 214: 155-159.

GMO-Compass (2012), *Pectinase*. [http://www.gmo-](http://www.gmo-compass.org/eng/database/enzymes/92.pectinase.html)

[compass.org/eng/database/enzymes/92.pectinase.html](http://www.gmo-compass.org/eng/database/enzymes/92.pectinase.html) (acedido em 7/4/14)

González-Arias C.A., Marín S., Sanchis V. & Ramos A.J. (2013). Mycotoxin

Bioaccessibility/absorption assessment using in vitro digestion models: A review.

World Mycotoxin Journal, 6(2): 167-184

Guerra A., Etienne-Mesmin L., Livrelli V., Denis S., Blanquet-Diot S. & Alric M.

(2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Cell, Trends in Biotechnology*, 30(11): 591-600.

Henk D.A., Eagle C. E., Brown K., Vanden Berg M. A., Dyer P. S., Peterson S. W. & Fisher M.C. (2011). Speciation despite globally overlapping distributions in *Penicillium*

chrysogenum: the population genetics of Alexander Fleming's lucky fungus. *Molecular Ecology*, 20: 4288–4301

IARC, International Agency for Research on Cancer. (1998). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Some naturally occurring and syntetic food components, furocoumarins and ultravioleta radiation*, volume 40. Lyon 1986: <http://www.inchem.org/documents/iarc/vol40/patulin.html> (acedido em 28/3/14)

IARC, International Agency for Research on Cancer. (2013). *IARC Monographs on The Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*.
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/> (acedido em 21/11/13)

InfoEscola. (2013). *Sistema Digestório*. <http://www.infoescola.com/wp-content/uploads/2009/11/sistema-digestorio.jpg> (acedido em 11/5/13)

Hur S.J., Lim B.O., Decker E.A. & McClements D.J. (2011) In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125: 1-12.

Kabak B., Brandon E.F.A., Var I., Blokland M. & Sips A.J.A.M. (2009). Effects of probiotic bacteria on the bioaccessibility of aflatoxin B₁ and ochratoxin A using an *in vitro* digestion model under fed conditions. *Journal of Environmental Scieence and Health Part B*, 44: 472-480.

Kopf-Bolanz K.A., Schwander F., Gijs M., Vergères G., Portmann R. & Egger L. (2012) Validation of in vitro digestive system for studying macronutrient decomposition in humans. *The Journal of Nutrition*, 142: 245-250.

Koppen R., Koch M., Siegelet D., Merke S., Maul R. & Nehlsal I. (2010). Determination of Mycotoxins in Foods: current state of analytical methods and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 1595-1612.

Krska R., Schubert-Ullrich P., Molinelli A., Sulyok M., MacDonald S. & Crews C. (2008). Mycotoxin analysis: An update. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 25 (2): 152-163. DOI: 10.1080/02652030701765723

Leggott N. & Shephard G. (2001). Patulin in South African commercial apple products. *Food Control*, 12(2): 73-6.

- Lopéz-Nicolás R., Gozález-Bermudéz C.A., Ros-Berruezo G. & Frontela-Saseta C. (2014). Influence of in vitro gastrointestinal digestion of fruit juices enriched with pine bark extract on intestinal microflora. *Food Chemistry*, 157: 14-19.
- MacDonald S, Long M, Gilbert J & Felgueiras I. (2000). Liquid chromatographic method for determination of patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree: Collaborative study. *Journal of AOAC International*; 83(6):1387-94.
- Malagelada J.R., Robertson J.S., Brown M.L., Remington M., Duenes J.A., Thomfode G.M. & Carryer P.W. (1984). Intestinal transit of solid and liquid components of a meal in health. *Gastroenterology*, 87: 1255-1263 in Versantvoort C.H., van de Kamp E. & Rempelberg C.J. (2004). *Development and applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food*. RIVM report 320102002/2004, Inspectorate for Health Protection.
- Marin S., Ramos A.J., Cano-Sancho G. & Sanchis V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60: 218-237.
- Martins C.T. (2013) Procedimento de ensaio: Determinação de Patulina em Produtos à Base de Maçã por SPE-HPLC-UV, DAN URQ-PE38_02 L. Departamento de Alimentação e Nutrição do INSA, 1-11.
- Meca G., Meneghelli G., Ritieni A., Mañes J. & Font G (2012). Influence of different soluble dietary fibers on the bioaccessibility of the minor Fusarium mycotoxin beauvericin. *Food and Chemical Toxicology*, 50: 1362-1368.
- Ménard O., Cattenoz T., Guillemain H., Souchon I., Deglaire A., Dupont D. & Picque D. (2014) Validation of a new in vitro dynamic system to simulate infant digestion. *Food Chemistry*, 145: 1039-1045.
- Paterson R. R. & Lima N. (2010). Toxicology of mycotoxins. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, 2: 31-63.
- Pombeiro A. J. (1983). *Técnicas e Operações Unitárias em Química Laboratorial*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 434-565.
- R-Biopharm (2010). *Pectinase*. <http://www.r-biopharm.com/?s=p54&lang=en&lang=en> (acedido em 7/4/14)

- Raiola A., Meca G., García-Llatas G. & Ritieni A. (2012a). Study of thermal resistance and in vitro bioaccessibility of patulin from artificially contaminated apple products. *Food and Chemical Toxicology*, 50: 3068-3072
- Raiola A., Meca G., Mañes J., & Ritieni A. (2012b). Bioaccessibility of Deoxynivalenol and its natural co-occurrence with Ochratoxin A and Aflatoxin B1 in Italian commercial pasta. *Food and Chemical Toxicology*, 50: 280–287
- Sagu S.T, Nso E.J., Karmakar S. & De S. (2014). Optimisation of low temperature extration of banana juice using commercial pectinase. *Food Chemistry*, 151: 182-190
- Scott R. (2012). *Library4Science*. <http://www.chromatography-online.org/HPLC/Introduction/rs1.html> (acedido em 23/1/13)
- Simões T. S., Queirós M. A. & Simões M. O. (2003). *Técnicas Laboratoriais de Química, Bloco I*. Porto Editora , 210-19.
- Shephard G. (2008). Determination of mycotoxins in human foods. *Chemical Society Reviews*, 37(11): 2468-77.
- Sigma (2014), *Solid Phase Extraction (SPE)*. <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spe.html> (acedido em 17/2/14)
- Spadaro D, Ciavarella A, Frati S, Garibaldi A & Gullino M. (2007). Incidence and level of patulin contamination in pure and mixed apple juices marketed in Italy. *Food Control*; 18(9):1098-102.
- Supelco (2013). *Catalog, SPE & General Sample Preparation*, Sigma-Aldrich Co.,. <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/supelco-catalog.html> (acedido em 28/05/2014)
- Tavares A.M., Alvito P., Loureiro S., Louro H. & Silva M.J. (2013). Multi-mycotoxin determination in baby foods and in vitro combined cytotoxic effects of aflatoxin M₁ and ochratoxin A. *World Mycotoxin Journal*, 6(4): 375-388. DOI: 10.3920/WMJ2013.1554
- Tortora G.J. & Derrickson B. (2009) *Principles of anatomy and physiology*, Twelfth Edition, John Wiley & Sons, Inc. 922-59.

Turner N. W., Subrahmanyam S. & Piletsky S. A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632: 168–180.

Unicef (2006). *Um quarto das crianças do mundo tem o peso baixo para a sua idade*. <http://www.unicef.pt/artigo.php?mid=18101112&m=3&sid=1810111218&cid=2003>, (acedido em 28/7/2014).

Versantvoort C.H., van de Kamp E. & Rompelberg C.J. (2004). *Development and applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food*. RIVM report 320102002/2004. Inspectorate for Health Protection, 13-23.

Versantvoort C. H., Oomen A. G. E. V., Rompelberg C. J. & Sips A. J. (2005). Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology* , 43, 31-40.

Waters. (2013). *HPLC - High Performance Liquid Chromatography*. http://www.waters.com/waters/pt_PT/HPLC---High-Performance-Liquid-Chromatography/nav.htm?cid=10048919 (acedido em 28/5/13)

Waters. (2013). *Goals and Benefits of SPE*. http://www.waters.com/waters/pt_PT/Goals-and-Benefits-of-SPE/nav.htm?cid=10083495&locale=pt_PT (acedido em 17/2/14)

WHO, World Health Organization. (1995). Evaluation of certain food additives and contaminants (Forty-fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). *WHO Technical Report Series, No. 859*, 36-38. Geneva. http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_859.pdf. (acedido em 27/3/14)

Zeila P.(2011). Contaminantes em alimentos para crianças – simulação do processo *in vitro* de nitratos. Dissertação de mestrado em Biologia Humana e Ambiente. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (26-34; 47-56).

6- Anexos

Conteúdo

Anexo I – Artigo Científico.....	79
Anexo II – Dados Atividades Experimentais	89
I - Estudo da bioacessibilidade de Patulina (PAT) em sumos de frutas contaminados artificialmente com e sem refeição (esparguete á bolonhesa)	89
II- Ensaio de recuperação de patulina em amostras digeridas com e sem refeição (guisado de borrego)	94
III- Determinação da bioacessibilidade de patulina em sumos de fruta contaminados artificialmente com e sem refeição (guisado de borrego)	99
IV- Quantificação da PAT em sumos de fruta contaminados artificialmente	103
V- Simulação da digestão infantil <i>in vitro</i> no estudo de Bioacessibilidade de Patulina (PAT) em sumos de frutas contaminados artificialmente	105
VI- Ensaio de recuperação de patulina em amostras digeridas com e sem refeição (guisado de borrego) com adição de pectinase	109
VII- Ensaio de digestão de amostras artificialmente contaminadas com patulina com e sem refeição (bolacha maria).....	114
VIII – Ensaio de recuperação e quantificação de patulina	118
Anexo III - Atividades Extras.....	123

APPLICABILITY OF IN VITRO METHODS TO STUDY PATULIN BIOACCESSIBILITY AND ITS EFFECTS ON INTESTINAL MEMBRANE INTEGRITY

Ricardo Assunção^{1,2}, Mariana Ferreira^{1,3}, Carla Martins¹, Irene Diaz^{1,4}, Beatriz Padilla^{1,5}, Didier Dupont⁶, Mauro Bragança⁷, Paula Alvito¹

¹Food and Nutrition Department, National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge I.P., Lisboa, Portugal

²Évora University, Évora, Portugal

³Faculty of Sciences, Lisboa University, Lisboa, Portugal

⁴Division of Toxicology, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands

⁵Universitat Politècnica de València, València, Spain

⁶French National Institute for Agricultural Research, Rennes, France

⁷Faculty of Veterinary Medicine, Lusófona University of Humanities and Technology, Lisboa, Portugal

In human health risk assessment, ingestion of food is considered a major route of exposure to many contaminants, although the total amount of an ingested contaminant (external dose) does not always reflect the quantity available for the body (internal dose). In this study, two in vitro methods were applied to study bioaccessibility and intestinal membrane integrity of cells exposed to patulin, a mycotoxin with significant public health risk. Seven artificially contaminated fruit juices were assayed in the presence or absence of a standard meal, showing a significant difference for bioaccessibility values between contaminated samples alone (mean $27.65 \pm 13.50\%$) and combinations with a standard meal (mean $7.89 \pm 4.03\%$). Different concentrations of patulin (PAT) and cysteine (CYS) (protector agent) were assayed in Caco-2 cells monolayers. At $95 \mu\text{M}$, PAT produced a marked decrease in transepithelial electrical resistance (TEER). This effect was significantly reduced when $400 \mu\text{M}$ and $4000 \mu\text{M}$ CYS was added to the cells. Combined use of in vitro digestion models with other techniques using intestinal cell lines, such as in vitro intestinal absorption models that use Caco-2 cells, may offer a more comprehensive model of what is occurring during digestion and absorption processes. The study of beneficial effects of protective agents would also be enhanced.

In today's changing world, safety and security have generally remained basic human needs. Ensuring the safety of food continues to be a major focus of international action (Food and Agriculture Organization [FAO], 2004). In order to determine acceptable levels of contaminants and toxins, the responsible agencies regularly monitor food supply. In human health risk assessment, ingestion of food is considered a major route of exposure to many contaminants generated either by industrial or environmental contamination or as result of production

processes, although the total amount of an ingested contaminant (external dose) does not always reflect the quantity available to the body (internal dose) (Versantvoort et al., 2005; Raiola et al., 2012a).

During the past decade, there has been an increasing interest in the use of in vitro methodologies to contribute to a more comprehensive risk assessment of ingested contaminants. The in vitro digestion model that simulates release of contaminants to digestive fluids (from mouth to intestine) and its combination with Caco-2

Address correspondence to Paula Alvito, Food and Nutrition Department, National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge I.P., Av. Padre Cruz, Lisboa 1649-016, Portugal. E-mail: paula.alvito@insa.min-saude.pt

cells, which simulates intestinal transport, is considered a powerful tool to predict effects of in vivo bioavailability of ingested compounds (Versantvoort et al., 2005; Turco et al., 2011; Hur et al., 2011).

The in vitro digestion models simulate, in a simplified manner, human digestion processes in the mouth, stomach, and small intestine to enable bioaccessibility investigations of food components from their matrix during transit in the gastrointestinal tract (GIT). Recently, COST FA 1005 INFOGEST, an international network granted by COST in the domain of food and agriculture, has been expanding and improving current basic knowledge on food digestion, as well as promoting harmonization of currently used digestion models (Dupont et al., 2011). These in vitro models attempt to recreate the aspects of human GIT physiology, such as chemical composition of digestive fluids, pH, and residence time periods typical for each compartment (Versantvoort et al., 2005; Hur et al., 2011). These models are a rapid, simple, and relatively inexpensive method to determine realistic worst-case internal exposure scenarios without use of animals. The experimental design can be completely adjusted to exposure scenarios formulated by the risk assessor, scenarios that are geared to real-life cases (Brandon et al., 2006; Hur et al., 2011). Bioaccessibility depends on the food matrix, as well as contamination level, and the manner in which food/feed is contaminated (spiked or naturally) (Versantvoort et al., 2004).

Since the GIT is the most frequent route for food contaminants exposure, the impact of food contaminants at the intestinal cells is important. Therefore, the use of in vitro cell culture systems with a monolayer of villus cells (which need to be viable, polarized, and fully differentiated and mimic the ones found in the intestine) provides a valuable tool in the study of compound transport. The Caco-2 cell line is one of the in vitro models most used to study intestinal absorption of chemicals at screening level. When these cells are seeded on semipermeable membranes, they form a continuous

monolayer with tight junctions, mimicking the intestinal barrier (Turco et al., 2011). Pinton et al. (2009) suggested the use of transepithelial electrical resistance (TEER) as a parameter that indicates alterations in the epithelial barrier function or in the transcellular permeability of ions. TEER quantifies the movement of ions across the cell barrier, which would be used to evaluate the integrity of the monolayer (De Walle et al., 2010). Opening of epithelial tight junctions may potentially allow transport of luminal antigens and/or bacteria, which lead to an inflammatory reaction (McLaughlin et al., 2009).

Among chemical hazards, the contamination of food and feed by mycotoxins represented a major food safety issue (World Health Organization [WHO], 2002). Mycotoxins are secondary metabolites produced by fungi producing teratogenic, carcinogenic, mutagenic, immunotoxic, or nephrotoxic effects on humans and animals (Pestka and Smolinski, 2005; Clark and Snedeker, 2006; van Egmond et al., 2007; Behm et al., 2012). The bioaccessibility of a given mycotoxin differs according to the considered food, as recently demonstrated in the case of the bioaccessibility of deoxynivalenol (DON) in different types of Italian pasta (Raiola et al., 2012b), beauvericin (BEA) in wheat crispy breads with different fiber concentrations (Meca et al., 2012b), and patulin (PAT) in different apple products (Raiola et al., 2012a). Recently, Gonzalez-Arias et al. (2013) reviewed most data on mycotoxin/absorption assessment using in vitro digestion models.

Patulin (PAT), a mycotoxin produced by *Penicillium* spp. during fruit spoilage, is a major concern with regard to human health because exposure resulted in severe acute and chronic toxicity, including genotoxicity, immunotoxicity, and neurotoxicity; thus, its maximum levels are included in EC Regulation 1881/2006 (Commission Regulation, EC N° 1881/2006: European Commission, 2006). Children are a population particularly vulnerable to this mycotoxin due to high consumption of apple-based products or fruit derivatives

(Barreira et al., 2010). Therefore, studies on bioaccessibility and absorption of PAT are needed. Until now, only two studies were performed to determine bioaccessibility of PAT in apple products. Raiola et al. (2012a) used an in vitro model based on sequential steps of gastric and duodenal digestion and reported PAT bioaccessibility values ranging from 71 to 25% for apple products under GIT conditions for children, characterized by lower levels of pancreatin, pepsin, and bile. Similarly, high PAT bioaccessibilities were found by Brandon et al. (2012) in apple products using the RIVM digestion model, reporting bioaccessibility values ranging between 55 and 100% for homemade apple sauce, spiked apple sauce, and baby fruit assayed alone or in combination with other foods, such as yogurt, cookies, and a standard Dutch dinner.

Given the potentially harmful health effects, it is important to further understand the effect of the PAT on the structure and function of the gut mucosa. Mahfoud et al. (2002) showed that exposure of intestinal epithelial cells to PAT resulted in a marked decrease in TEER for mycotoxin concentrations between 50 and 90 μM . McLaughlin et al. (2009) verified that for concentrations of 100 μM , a 95% reduction in TEER was noted after 5-h cell exposure. Mohan et al. (2012) demonstrated that PAT has the capacity to directly alter permeability and ion transport in intact intestinal mice mucosa.

Prevention or reduction of adverse effects by mycotoxins for humans and animals is an important issue. Mahfoud et al. (2002) reported reduction of TEER in cells exposed to co-administered PAT and cysteine (CYS). de Melo et al. (2012) found DNA damage in organs of mice following intraperitoneal administration of PAT. However, treatment with *N*-acetylcysteine (NAC) decreased oxidative PAT-induced damage. The aim of this study was to examine PAT bioaccessibility and effect on intestinal membrane integrity using in vitro models. In order to achieve this objective, the use of a standard meal undergoing digestion and TEER variation exposed to different mixtures of PAT and CYS were studied.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and Standard Solutions

Potassium chloride (KCl), potassium thiocyanate (KSCN), monosodium phosphate (NaH_2PO_4), sodium chloride (NaCl), sodium bicarbonate (NaHCO_3), calcium chloride (CaCl_2), ammonium chloride (NH_4Cl), monopotassium phosphate (KH_2PO_4), magnesium chloride (MgCl_2), urea, hydrochloric acid (HCl), pepsin, pancreatin, bovine serum albumin, and glucose were obtained from Merck (VWR, Portugal). α -Amylase, lipase, and bile salts were purchased from Sigma-Aldrich (Dias de Sousa, Portugal). Mucin and uric acid were purchased from Carol Roth GmbH (BetaLab, Portugal) and BDH Prolabo (VWR, Portugal), respectively. Ethyl acetate, *n*-hexane, and acetonitrile (all high-performance liquid chromatography [HPLC] grade), and ethanol, acetic acid, and anhydrous sodium hydrogen carbonate (all extra pure grade), perchloric acid 60% and anhydrous sodium sulphate (p.a.), and sand (purified) were all purchased from Merck (VWR, Portugal). The patulin standard was ordered from Sigma (Dias de Sousa, Portugal). Water was ultrapure (Milli-Q from Millipore, Interface, Portugal). Stock solution with 200 mg/L PAT was prepared in ethyl acetate. This solution was stored at -20°C , and when necessary an appropriate volume was evaporated and diluted with ethanol for preparation of an intermediate standard solution. The concentration of the PAT intermediate standard solution was determined by ultraviolet (UV) detection at 276 nm, against a solvent blank, using the molar extinction value. Appropriate amounts of the intermediate standard solution were diluted with 0.1% acetic acid in order to get final concentrations between 8 and 100 $\mu\text{g/L}$.

Sampling

Seven commercial fruit juices (3 cloudy and 4 clear juices) of different brands containing apple or a mixture of apple with other fruit juices were purchased in supermarkets in the city of Lisbon in 2012–2013. These samples

were previously found not to be contaminated with PAT by HPLC with UV detection (Barreira et al., 2010) and then for bioaccessibility assays artificially contaminated at 200 µg PAT/kg, a concentration that enabled obtaining quantifiable PAT values after digestion dilution and in the working range applied (8 and 100 µg/L reflecting PAT levels of 3.2 and 40 µg PAT/kg).

In Vitro Digestion Model

Bioaccessibility studies were performed according to the *in vitro* digestion model under fed conditions described by Versantvoort et al. (2005). This model consists of a short incubation (5 min) of sample with saliva, addition of gastric juice followed by a 2-h incubation, and addition of duodenal and bile juice followed by a 2-h incubation. All incubations were performed at $37 \pm 2^\circ\text{C}$, and during incubation the samples were rotated head over heels. After the last incubation phase the sample was centrifuged. The experiments were performed in the presence or absence of a standard meal (commercial baby food “meat with spaghetti”) in duplicate. Bioaccessibility of PAT was expressed as percent difference between amount of PAT after and before digestion.

Patulin Extraction

For PAT extraction, the cleanup procedure and preparation of stock standard solutions were performed according to conditions described by Arranz et al. (2005). Briefly, sample material was extracted with an ethyl acetate extraction solvent in the presence of sodium sulfate and sodium hydrogen carbonate and then cleaned up over an unconditioned silica gel solid-phase extraction (SPE) column (Strata Si 500 mg/3 ml, Phenomenex). The purified extract was evaporated to dryness, redissolved in aqueous acetic acid solution (pH 4), separated by reverse-phase (RP) HPLC, and quantitatively determined by UV detection at 276 nm.

HPLC-UV Analysis

Analytical conditions used for patulin determination were reported in Barreira et al. (2010). The HPLC apparatus was a Waters Alliance 2695 system equipped with a photodiode array detector, Waters 2998, set at 276 nm. Data collection and subsequent processing were performed using the Empower 2 Software. A stainless-steel analytical column (250 × 4.6 mm ID, 4 µm, Synergy Hydro-RP C18; Phenomenex) and a guard column (4 × 3 mm ID) with the same stationary phase were used. The mobile phase, eluting at a flow rate of 1 ml/min, consisted of an isocratic mixture of water–acetonitrile–perchloric acid (96:4:0.1) for 20 min followed by a 5-min gradient washing step, which starts with a concentration of 100% acetonitrile and ends with a concentration of 65% acetonitrile in water. Injection sample volume was 200 µl. All samples were analyzed in duplicate and mean PAT values were expressed as micrograms per kilogram (µg/kg). This analytical method was accredited for apple based juices and purées, according to ISO 17025 (2005), presenting a limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of 0.9 µg/kg and 2.9 µg/kg, respectively, and a variation coefficient of 3%.

Cell Culture Conditions and Intestinal Membrane Integrity (Transepithelial Electrical Resistance Evaluation)

Caco-2 cells derived from the American Tissue Culture Collection (ATCC) were routinely grown in an atmosphere of 5% carbon dioxide at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), with 25 mM HEPES buffer, 4.5 g/L glucose, L-glutamine, and phenol red and without pyruvate (Gibco, Invitrogen). Cell differentiation, monolayer development, and intestinal membrane integrity assay were performed according to conditions described by Brand et al. (2008, 2010) and Padilla (2008). The cells were seeded at a density of 1×10^5 cells/cm² on 0.4-µm pore size 12-well plate polycarbonate inserts (Costar, Corning). The cells for monolayer development were used between passages 25 and 34 and maintained in

a standard culture medium (regularly changed three times a week). The experiments were performed after 18–20 d of cell monolayer growth. Barrier impairment after exposure to PAT was assessed by measuring the transepithelial electrical resistance (TEER). The acceptance criteria of TEER measures for this cell line was between 500 and 1000 $\Omega\text{-cm}^2$. TEER values were recorded in the culture medium at 37°C with chopstick electrodes (Millicell-ERS, Millipore).

Patulin and Co-Administration With Cysteine

For the evaluation of the effect of PAT in barrier integrity of Caco-2 cells, 3 different exposure concentrations were selected: 25 nM ($n = 2$), 40 μM ($n = 3$) and 95 μM ($n = 4$). The first simulated the value closest to the real situation of PAT exposure in European countries (Majerus and Kapp, 2002). The others provided two approaches close to the range of PAT concentrations reported to have barrier integrity effects (Mahfoud et al., 2002). Incubation of cells with PAT were performed for 0, 1, 2, 3, 6, or 24 h, and TEER was evaluated before and after cell exposure to mycotoxin for all assays. For co-administration assays, PAT (95 μM) was mixed with 3 concentrations of L-CYS (VWR, Portugal): 40, 400, or 4000 μM . All co-administration assays were performed in duplicate.

Statistical Analysis

Descriptive statistics were computed to evaluate continuous variables, such as PAT bioaccessibility, according to various factors such as presence or absence of a standard meal or nature of fruit juices (clear and cloudy) and barrier integrity (expressed as TEER values), taking into account different PAT concentrations and durations. Inferential statistics was applied considering a 5% significance level. For either paired samples or paired trials, the *t*-test for paired samples or the nonparametric Wilcoxon signed rank alternative, when normality failed,

were used. For independent samples analyses, the Mann–Whitney test was used because of normality check failure or small sample size. All statistics were computed using IBM PASW 19 (R).

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of Addition of a Standard Meal and Nature of Fruit Juices

Bioaccessibility values in the absence of a standard meal ranged between 14.33 and 48.52% with a mean of $27.65 \pm 13.5\%$. Bioaccessibility values in the presence of a standard meal ranged between 1.67% and 15.11% with a mean value of $7.89 \pm 4.03\%$ (Table 1). Bioaccessibility in the absence of a standard meal was significantly higher than in the presence of a standard meal. The mean bioaccessibility value for clear fruit juices (24.68%) was not significantly lower than for cloudy juices (31.6%) in the absence of a standard meal. In contrast, the mean bioaccessibility value for clear fruit juices (9.71%) was not significantly higher than for cloudy juices (5.46%) in the presence of a standard meal.

Few data are available concerning bioaccessibility of PAT in fruit or apple products. Brandon et al. (2012) evaluated bioaccessibility of PAT in one homemade apple sauce, one commercial apple sauce, and one commercial baby fruit using the same in vitro digestion model reported in this study with addition of a standard Dutch dinner (infant food with leek, mushrooms with ham and carrot), yogurt, or children's cookie. Bioaccessibility values for naturally contaminated applesauce ranged between 55 and 85%. The spiked samples showed numerically higher bioaccessibilities than naturally contaminated samples. Brandon et al. (2012) indicated that bioaccessibility of PAT was high and used a value of 100% in their risk assessment. These results are higher than those reported in the present study using a standard meal (1.67–15.11%). This difference might be attributed to different

TABLE 1. Bioaccessibility (%) of Patulin in Seven Selected Fruit Juices (Clear and Cloudy), in the Absence or Presence of a Standard Meal

Fruit juice	Nature	Bioaccessibility (%)		Bioaccessibility (%)	
		Absence standard meal	Mean \pm SD	Presence standard meal	Mean \pm SD
Apple and other 3 fruits	Clear	17.97 19.43	18.70 \pm 1.03	13.25 12.73	12.99 \pm 0.37
Apple and other 8 fruits	Clear	16.41 15.78	16.10 \pm 0.45	15.11 1.67	8.39 \pm 9.50
Apple and other 8 fruits	Clear	48.52 48.25	48.39 \pm 0.19	9.41 6.58	7.99 \pm 2.00
Apple	Clear	14.33 16.77	15.55 \pm 1.73	6.80 12.17	9.48 \pm 3.80
Apple	Cloudy	27.57 26.76	24.68 \pm 14.71 27.17 \pm 0.57	4.50 4.80	9.71 \pm 4.47 4.65 \pm 0.21
Apple and carrot	Cloudy	22.59 20.07	21.33 \pm 1.78	5.39 4.71	5.05 \pm 0.48
Apple and other 5 fruits	Cloudy	44.46 48.14	46.30 \pm 2.60	5.14 8.22	6.68 \pm 2.18
Total			31.60 \pm 11.77 27.65 \pm 13.50*		5.46 \pm 1.39 7.89 \pm 4.03*

Note. SD = standard deviation. Asterisk indicates statistical significance was assessed by Mann-Whitney test with $p < .05$, comparing patulin bioaccessibility in the absence and presence of a standard meal.

food matrix used as a standard meal in the present study ("meat with spaghetti"). In fact, Raiola et al. (2012b) reported that different types of pasta might affect bioaccessibility of mycotoxins (DON), and this may have also occurred with PAT. The presence of fruits other than apple in fruit juices may also contribute to obtain lower PAT bioaccessibility values. The use of a different food matrix needs to be further evaluated, since a potent matrix binding was detected as previously reported Gonzalez-Arias et al. (2013), and this affects PAT bioaccessibility. Fruit juices are frequently drunk in combination with foods, mainly by children; thus, it is important to simulate different food components in feeding conditions. The effectiveness of extraction of PAT in the presence of a standard meal and potential interactions between PAT and digestive juices also need to be taken into account in future studies in order to elucidate factors interfering in mycotoxin bioaccessibility.

Mean PAT bioaccessibility values determined for clear juices (24.68%) are close to those found by Raiola et al. (2012a) for two apple clarified juices (29 and 25%). For cloudy

juices, mean bioaccessibility values are lower (31.60%) than those reported for two apple juices with pulp (71 and 67%). Raiola et al. (2012a) used a different in vitro digestion method adapted to children conditions, which hampers an accurate comparison of bioaccessibility results. Harmonized conditions for in vitro digestion models are needed to allow a more accurate comparison of bioaccessibility data for adult and child digestion.

Finally, concerning the digestion procedure and variability of PAT bioaccessibility values, an artificial PAT contamination of 200 $\mu\text{g/kg}$ was used in this study that involves a dilution of the toxin concentration in 38 ml digestive fluids (6 ml saliva + 12 ml gastric + 12 ml duodenal + 6 ml bile + 2 ml hydrogen carbonate). However, Raiola et al. (2012a) reported the use of contamination levels close to the legislative limit (50 $\mu\text{g/kg}$ for juices). This difference in PAT spiked levels cannot be attributed to the analytical chromatographic conditions used in PAT quantification (since the LOD and LOQ used in this study, 0.9 and 2.9 $\mu\text{g/kg}$, are lower than those reported by Raiola et al. [2012a] at 5 and 15 $\mu\text{g/kg}$) but probably is

due to the digestion procedure. The variability of bioaccessibility values in the same sample (e.g., 1.67 and 15.11%) and the within-day and between-day variations and increase of replica number need to be further analyzed.

Effect of Patulin in the Intestinal Membrane Integrity

Data showed a marked decrease (80%) in TEER values following 24-h exposure to 95 μM PAT, starting at 1 h of treatment. For lower concentrations, 25 nM and 40 μM , TEER was numerically reduced (below 25%) as presented in Figure 1. Incubation of cells with PAT at 95 μM combined with CYS at 40 μM produced an approximate 5-fold decrease in TEER values. In contrast, no change in TEER values was observed in the presence of a mixture of PAT with CYS at 400 or 4000 μM , as shown in Figure 2. A significant difference in TEER values was noted for the co-administration of PAT with concentrations equal to or higher than CYS 400 μM .

The fact that the mycotoxin PAT altered the barrier function of the intestinal epithelium was previously reported. McLaughlin et al. (2009) demonstrated that PAT reduced barrier properties of the intestinal cell line Caco-2 by altering the expression levels and/or

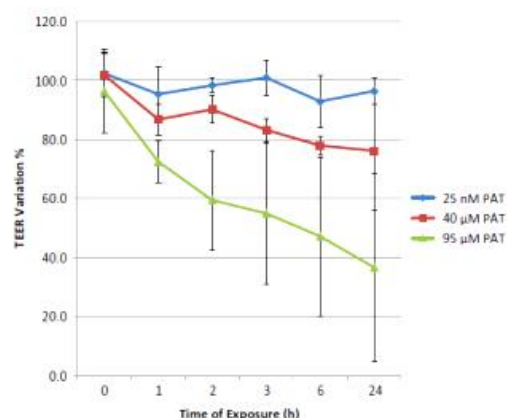


FIGURE 1. Effect of patulin on the transepithelial electrical resistance (TEER) after 24 h of cells exposure to 25 nM ($n = 2$), 40 μM ($n = 3$), and 95 μM ($n = 4$) concentrations. Results are the mean of TEER variation % \pm SD (standard deviation).

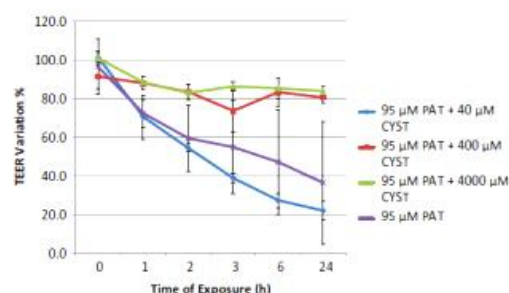


FIGURE 2. Effect of patulin (95 μM = control) and patulin co-administrated with cysteine on the transepithelial electrical resistance (TEER) after 24 h of cells exposure to cysteine at 40 μM ($n = 2$), 400 μM ($n = 2$), and 4000 μM ($n = 2$) concentrations. Statistical significance was assessed by Wilcoxon signed rank test, comparing different concentrations of cysteine, with $p < .05$ for 400 μM and 4000 μM of cysteine. Results are the mean of TEER variation % \pm SD (standard deviation).

distribution of several tight junction proteins. McLaughlin et al. (2009) suggested that PAT produced a loosening of the tight junction, which potentially allowed the transport of luminal antigens and/or bacteria and led to an inflammatory reaction. Mahfoud et al. (2002) showed that exposure of HT-29-D4 and Caco-2-14 cells to PAT concentrations between 50 and 90 μM inhibited TEER by 100%. Mahfoud et al. (2002) indicated that the inhibitory effect of PAT on TEER was closely associated with its reactivity for SH groups and sulfhydryl-reacting compounds such as CYS and glutathione that prevented the cells from PAT-induced injury. de Melo et al. (2012) reported on DNA damage in organs of mice treated with PAT administered intraperitoneally and found that *N*-acetylcysteine diminished PAT-induced oxidative damage, thereby ameliorating the genotoxic effects of the mycotoxin. However, this route of administration is different from the natural route of exposure by ingestion.

As reported in the present study, the use of in vitro intestinal models as the Caco-2 cells system simulates realistic exposure scenario, and could be useful in evaluating the effects of possible treatment against adverse effects induced by PAT exposure. The lowest PAT concentration studied in the intestinal membrane integrity assay (25 nM) represented relevant PAT exposure in European countries, as

57 µg/kg body weight/d (Majerus and Kapp, 2002) for a 70-kg adult (3500 ng/d, reflecting a PAT concentration close to 25 nM). This concentration was in the range of the PAT concentration obtained after digestion studies, reinforcing the correlation between in vitro digestion and absorption experiments. However, in an attempt to improve a situation closer to reality, the supernatant obtained after in vitro digestion assay needs to be used to directly inoculate the Caco-2 cells monolayer in order to simulate and assess the eventual effects of digestive fluids on intestinal membrane integrity.

CONCLUSIONS

Despite their physiological relevance, in vivo assays cannot always be conducted because of ethical reasons, technical constraints, costs, and high interindividual variability (Ménard et al., 2014). To bypass these limitations, an alternative way to study digestion and intestinal transport is to use in vitro systems, such as digestion models and Caco-2 cells. Concerning in vitro digestion models, some factors might interact and affect the bioaccessibility of food contaminants. As shown in this study, the addition of a standard meal ("meat with and spaghetti") might significantly affect bioaccessibility of PAT in fruit juices. The inclusion of a standard meal influenced the physical structure of fruit juices, leading to a decrease in bioaccessibility. It is suggested that more studies be performed to examine the effect of other food components on bioaccessibility of PAT in fruit products and its within-day and between-day variation. The development of a harmonized in vitro digestion model that allows performing a more accurate comparison of bioaccessibility values from different studies is also highly recommended.

In vitro intestinal models using Caco-2 cells may contribute to elucidate the mechanisms of action of food contaminants as well as protective effects. The current study reported that PAT produced a reduction in Caco-2 cells'

barrier integrity, which was inhibited by co-administration of 400 or 4000 µM CYS. The study of barrier integrity using Caco-2 cells was found to be useful in evaluating the protective effects of antioxidant substances against mycotoxins by using CYS. Thus, the intestinal in vitro model might also be useful in evaluating the effects of possible treatment against adverse effects induced by PAT or other food contaminants.

Combined use of in vitro digestion models with other techniques using intestinal cell lines such as in vitro intestinal absorption models that use Caco-2 cells (De Nijs et al., 2012), as well as concurrently examining transepithelial transport (Meca et al., 2012a; Prosperini et al., 2012), offers a more comprehensive picture of what is occurring during digestion and absorption of food contaminants in the GIT. This subsequently contributes to providing a more accurate risk assessment of food contaminants.

FUNDING

This study was supported by the "MycMix" project (PTDC/DTP-FTO/0417/2012), funded by the Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), Portugal and National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge I.P. Lisboa, Portugal. The authors are participants in COST Action FA1005 (Infogest).

REFERENCES

- Arranz, I., Derbyshire, M., Kroeger, K., Mischke, C., Stroka, J., and Anklam, E. 2005. Liquid chromatographic method for quantitation of patulin at 10 ng/mL in apple-based products intended for infants: Interlaboratory study. *J. AOAC Int.* 88: 518–525.
- Barreira, M. J., Alvito, P. C., and Almeida, C. M. M. 2010. Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal. *Food Chem.* 121: 653–658.
- Behm, C., Follmann, W., and Degen, G. H. 2012. Cytotoxic potential of mycotoxins in

- cultures of V79 lung fibroblast cells. *J. Toxicol. Environ. Health A* 75: 1226–1231.
- Brand, W., van der Wel, P. A. I., Rein, M. J., Barron, D., Williamson, G., van Bladeren, P. J., and Rietjens, I. M. C. M. 2008. Metabolism and transport of the citrus flavonoid hesperetin in Caco-2 cell monolayers. *Drug Metab. Dispos.* 36: 1794–1802.
- Brand, W., Padilla, B., van Bladeren, P. J., Williamson, G., and Rietjens, I. M. 2010. The effect of co-administered flavonoids on the metabolism of hesperetin and the disposition of its metabolites in Caco-2 cell monolayers. *Mol. Nutr. Food Res.* 54: 851–860.
- Brandon, E. F. A., Oomen, A. G., Rempelberg, C. J. M., Versantvoort, C. H. M., van Engelen, J. G. M., and Sips, A. J. A. M. 2006. Consumer product *in vitro* digestion model: Bioaccessibility of contaminants and its application in risk assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 44: 161–171.
- Brandon, E. F. A., Baars, A. J., Te Biesebeek, J. D., Oomen, A. G., Bakker, M. I., and De Heer, C. 2012. Risk assessment of patulin intake from apple containing products by young children. *World Mycotoxin J.* 5: 391–403.
- Caloni, E., Cortinovis, C., Pizzo, E., and De Angelis, I. 2012. Transport of aflatoxin M₁ in human intestinal Caco-2/TC7 cells. *Front. Pharmacol.* 3: 1–8.
- Clark, H. A., and Snedeker, S. M. 2006. Ochratoxin A: Its cancer risk and potential for exposure. *J. Toxicol. Environ. Health B* 9: 265–296.
- de Melo, F. T., de Oliveira, I. M., Greggio, S., Dacosta, J. C., Guecheva, T. N., Saffi, J., Henriques, J. A. P., and Rosa, R. M. 2012. DNA damage in organs of mice treated acutely with patulin, a known mycotoxin. *Food Chem. Toxicol.* 50: 3548–3555.
- De Nijs, M., Van den Top, H. J., Portier, L., Oegema, G., Kramer, E., Van Egmond, H. P., and Hoogenboom, L. A. P. 2012. Digestibility and absorption of deoxynivalenol-3-beta-glucoside in *in vitro* models. *World Mycotoxin J.* 5: 319–324.
- De Walle, J. V., Sargent, T., Piront, N., Toussaint, O., Schneider, Y., and Larondelle, Y. 2010. Deoxynivalenol affects *in vitro* intestinal epithelial cell barrier integrity through inhibition of protein synthesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 245: 291–298.
- Dupont, D., Bordon, A., Brodtkorb, A., Capozzi, F., Cirkovic Velickovic, T., Corredig, M., Cotter, P. D., Noni, I. D., Gaudichon, C., Golding, M., Lea, T., Huërou-Luron, I. L., Mackie, A., Madsen, C. B., Meulenaer, B. D., Nys, Y., Pihlanto, A., Recio, I., Rémond, D., Requena, T., Souchon, I., Swiatecka, D., Turgeon, S., Vegarud, G., Vreeburg, R., Weitschies, W., and Wickham, M. 2011. An international network for improving health properties of food by sharing our knowledge on the digestive process. *Food Digest.* 2: 23–25.
- European Commission. 2006. Commission Regulation (EC) 1881/2006 of 19 December 2006. *Off. J. Eur. Commun.* L364.
- Food Agriculture Organization of the United Nations. 2004. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. Food and Nutrition Paper 81. Rome, Italy: FAO.
- González-Arias, C. A., Marín, S., Sanchis, V., and Ramos, A. J. 2013. Mycotoxin bioaccessibility/absorption assessment using *in vitro* digestion models: A review. *World Mycotoxin J.* 6: 167–184.
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., and McClements, D. J. 2011. *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chem.* 125: 1–12.
- ISO/IEC 17025:2005. 2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- Mahfoud, R., Maresca, M., Garmy, N., and Fantini, J. 2002. The mycotoxin patulin alters the barrier function of the intestinal epithelium: Mechanism of action of the toxin and protective effects of glutathione. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 181: 209–218.
- Majerus, P., and Kapp, K. 2002. Assessment of dietary intake of patulin by the population of EU Member States. Report on tasks for scientific cooperation (SCOOP). Task 3.2.8. Directorate General Health and

- Consumer Protection. Germany. http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/3.2.8_en.pdf
- McLaughlin, J., Lambert, D., Padfield, P. J., Burt, J. P. H., and O'Neill, C. A. 2009. The mycotoxin patulin modulates tight junctions in Caco-2 cells. *Toxicol. In Vitro* 23: 83–89.
- Meca, G., Meneghelli, G., Ritieni, A., Mañes, J., and Font, G. 2012a. Influence in different soluble dietary fibers on the bioaccessibility of the minor *Fusarium* mycotoxin beauvericin. *Food Chem. Toxicol.* 50: 1362–1368.
- Meca, G., Meneghelli, G., Ritieni, A., Mañes, J., and Font, G. 2012b. Study of the potencial toxicity of commercial crispy breads by evaluation of bioaccessibility and bioavailability of minor *Fusarium* mycotoxins. *Food Chem. Toxicol.* 50: 288–294.
- Ménard, O., Cattenoz, T., Guillemin, H., Souchon, I., Deglaire, A., Dupont, D., and Picque, D. 2014. Validation of new *in vitro* dynamic system to simulate infant digestion. *Food Chem.* 145: 1039–1045.
- Mohan, H. M., Collins, D., Maher, S., Walsh, E. G., Winter, D. C., O'Brien, P. J., Brayden, D. J., and Baird, A. W. 2012. The mycotoxin patulin increases colonic epithelial permeability *in vitro*. *Food Chem. Toxicol.* 50: 4097–4102.
- Padilla, B. 2008. Modulating intestinal transport of the citrus flavonoid hesperetin and its metabolites in-vitro (Caco-2 cells monolayers). Food safety MSc thesis. Sub-department of Toxicology, Agrotechnology and Food Sciences Department, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- Pestka, J. J., and Smolinski, A. T. 2005. Deoxynivalenol: Toxicology and potential effects on humans. *J. Toxicol. Environ. Health B* 8: 39–69.
- Pinton, P., Nougayrède, J., Del Rio, J., Moreno, C., Marin, D. E., Ferrier, L., Bracarense, A., Kolf-Clauw, M., and Oswald, I. P. 2009. The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 237: 41–48.
- Prosperini, A., Meca, G., Font, G., and Ruiz, M. 2012. Study of the cytotoxic activity of beauvericin and fusaproliferin and bioavailability *in vitro* Caco-2 cells. *Food Chem. Toxicol.* 50: 2356–2361.
- Raiola, A., Meca, G., García-Llatas, G., and Ritieni, A. 2012a. Study of thermal resistance and *in vitro* bioaccessibility of patulin from artificially contaminated apple products. *Food Chem. Toxicol.* 50: 3068–3072.
- Raiola, A., Meca, G., Manes, J., and Ritieni, A. 2012b. Bioaccessibility of deoxynivalenol and its natural co-occurrence with ochratoxin A and aflatoxin B1 in Italian commercial pasta. *Food Chem. Toxicol.* 50: 280–287.
- Turco, L., Catone, T., Caloni, F., Consiglio, E., Testai, E., and Stammati, A. 2011. Caco-2/TC7 cell line characterization for intestinal absorption: How reliable is this *in vitro* model for the prediction of the oral dose fraction absorbed in human? *Toxicol. In Vitro* 25: 13–20.
- Van Egmond, H. P., Schothorst, R. C., and Jonker, M. A. 2007. Regulations relating to mycotoxins in food. Perspectives in a global and European context. *Anal. Bioanal. Chem.* 389: 147–157.
- Versantvoort, C. H. M., Oomen, A. G., Van de Kamp, E., Rempelberg, C. J. M., and Sips, A. J. A. M. 2005. Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food Chem. Toxicol.* 43: 31–40.
- Versantvoort, C. H. M., Van de Kamp, E., and Rempelberg, C. J. M. 2004. Development and applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food. RIVM report 320102002/2004. http://rivm.openrepository.com/rivm/bitstream/10029/8885/1/320102002.pdf?origin=publication_detail
- World Health Organization. 2002. *WHO global strategy for food safety*. Food Safety Programme 2002. http://www.who.int/food_safety/publications/general/en/strategy_en.pdf?ua=1

Anexo II – Dados Atividades Experimentais

I - Estudo da bioacessibilidade de Patulina (PAT) em sumos de frutas contaminados artificialmente com e sem refeição (esparguete á bolonhesa)

Neste ensaio foram analisados 6 sumos contaminados artificialmente com 200µg/kg PAT em duplicado digeridos sem refeição.

Correspondência de amostras:

1.1/1.2-9.1/9.2	Multifrutos1	6.1/6.2-14.1/14.2	Eq. 100%Maçã
3.1/3.2-11.1/11.2	Frutos Variados	7.1/7.2-15.1/15.2	Multifrutos 2
5.1/5.2-13.1/13.2	Maçã-Cenoura	8.1/8.1-16.1/16.2	Cocktail Junior

Tabela XVI - Bioacessibilidade de Patulina em 6 sumos de fruta analisados em duplicado na ausência de refeição

	Material em Estudo	Quantidade matriz (g)	Quantidade HCl/NaOH adicionada (mL)	Concent Digerido µg /kg	µg no volume total do quimo	Libertação (µg/kg matriz)	Concentração Total na Matriz (µg/kg matriz)	Bioacessibilidade (%)	Bioacessibilidade média (%)
1-1	Multifrutos 1	4,60	0,010	6,680	0,151	32,827	200,0	16,41	
1-2		4,53	0,040	6,330	0,143	31,555	200,0	15,78	16
3-1	Frutos variados	4,58	0,010	7,330	0,166	36,168	200,0	18,08	
3-2		4,60	0,010	7,950	0,180	39,110	200,0	19,55	19
5-1	Maçã-cenoura	4,62	0,010	9,220	0,209	45,171	205,6	21,97	
5-2		4,58	0,010	8,140	0,184	40,134	205,6	19,52	21
6-1	100% maçã equilibrado	4,56	0,010	6,080	0,259	56,777	200,8	28,28	
6-2		4,56	0,010	5,900	0,251	55,115	200,8	27,45	28
7-1	Multifrutos 2	4,77	0	10,820	0,463	97,050	200,0	48,52	
7-2		4,70	0,010	10,610	0,453	96,490	200,0	48,25	48
8-1	Cocktail Junior	4,67	0	9,740	0,416	88,917	200,0	44,46	
8-2		4,67	0	10,540	0,450	96,286	200,0	48,14	46

Tabela XVII - Bioacessibilidade de Patulina em 6 sumos de fruta analisados em duplicado na presença de refeição

	Material em Estudo	Quantidade matriz (g)	Quantidade refeição controle (g)	Quantidade HCl/NaOH adicionada (mL)	Concent Digerido µg/kg	µg no volume total do quimo	Libertação (µg/kg matriz)	Concentração Total na Matriz (µg/kg matriz)	Bioacessibilidade (%)
9-1	Multifrutos 1	4,54	4,78	0,020	5,020	0,137	30,213	200,0	15,11
9-2		4,52	4,84		0,550	0,015	3,331	200,0	1,67
11-1	Frutos variados	4,96	4,77		4,770	0,132	26,678	200,0	13,34
11-2		4,58	5,91		4,120	0,117	25,627	200,0	12,81
13-1	maçã-cenoura	4,62	4,72		1,820	0,050	10,779	205,6	5,24
13-2		4,89	4,19		1,700	0,046	9,415	205,6	4,58
14-1	100% Maçã Equilibrado	5,08	4,00		1,000	0,047	9,273	200,0	4,64
14-2		4,47	4,02		0,950	0,044	9,880	200,0	4,94
15-1	Multifrutos 2	4,63	4,20		1,860	0,087	18,811	200,0	9,41
15-2		4,71	4,23		1,320	0,062	13,167	200,0	6,58
16-1	Cocktail Júnior	4,83	4,45		1,050	0,050	10,280	200,0	5,14
16-2		4,88	4,28		1,700	0,080	16,444	200,0	8,22

Sample Set 17-10-2013 (SS131017_PAT):

Vials	Solução	µL	Condição	Método	Tempo
1	Fase móvel	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
2	pH4	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
3	P8	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
4	P16	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
5	P25	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
6	P50	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
7	P100	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
8	1.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
9	1.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
10	3.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
11	3.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
12	5.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
13	5.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
14	6.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
15	6.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
16	7.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
17	7.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
18	8.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
19	8.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
			Condition Column	Lavagem acetoneitrilo2998_set	60
			Condition Column	Lav_AcetAgua_65%2998_set	30
			Condition Column	Paragem_Acet_Agua65%2998_set	10,1

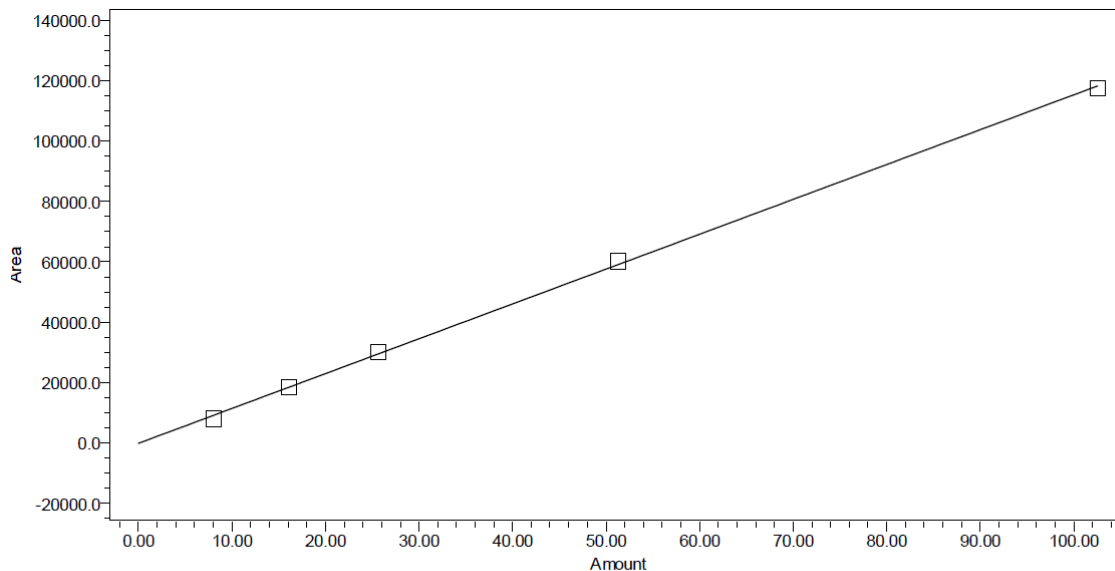
Sample Set 22-11-2013 (ss131122Pat):

Vials	Solução	µL	Condição	Método	Tempo
1	Fase móvel	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
2	pH4	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
3	P8	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15

Simulação in vitro do processo digestivo de patulina em sumos de fruta

4	P16	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
5	P25	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
6	P50	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
7	P100	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
8	9.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
9	9.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
10	11.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
11	11.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
12	13.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
13	13.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
14	14.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
15	14.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
16	15.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
17	15.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
18	16.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
19	16.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
			Condition Column	Lavagem acetonitrilo2998_set	60
			Condition Column	Lav_AcetAgua_65%2998_set	30
			Condition Column	Paragem_Acet_Agua65%2998_set	10,1

Processing Method:	SS131017_Proc	System:	HPLC7a
Processing Method ID:	40536	Channel:	2998 Ch1 276nm@1.2nm
Calibration ID:	40540	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 276nm@1.2nm
Date Calibrated:	10/21/2013 11:57:58 AM Europe/Lisbon		



Peak Name: Patulina; RT: 12.711; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 40541; R: 0.999765; R²: 0.999530; Weighting: None; Equation: $Y = 1,15e+003 X - 1,27e+002$; Normalized Intercept/Slope: -0.001984; RSD(E): 2.355275

Peak: Patulina

	Sample Name	Result Id	Peak Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	S1 - 8	40547	Patulina		8.060	7967.100	7.013	14.93	No	No
2	S2 - 16	40548	Patulina		16.110	18548.900	16.182	-0.45	No	No
3	S3 - 25	40549	Patulina		25.640	30067.950	26.164	-2.00	No	No
4	S4 - 50	40550	Patulina		51.270	60221.650	52.292	-1.95	No	No
5	S5 - 100	40551	Patulina		102.540	117552.651	101.969	0.56	No	No

Reported by User: Maria João Barreira (Mjbarreira)
 Report Method: LC Calibration Report
 Report Method ID 1015
 Page: 1 of 1

Project Name: Patulina
 Date Printed:
 10/21/2013
 2:20:10 PM Europe/Lisbon

II- Ensaio de recuperação de patulina em amostras digeridas com e sem refeição (guisado de borrego)

Amostras contaminadas inicialmente com 200 µg/kg de PAT (quadruplicado de cada amostra – 4 com refeição, 4 sem refeição) e fortificadas após a digestão com 20 µg/kg de PAT (dois exemplares de cada, 2 com refeição, 2 sem refeição).

Correspondência amostras:

1.1/1.2/1.3/1.4	Maçã c/ refeição	3.1/3.2/3.3/3.4	Bongo c/ refeição
2.1/2.2/2.3/2.4	Maçã s/ refeição	4.1/4.2/4.3/4.4	Bongo s/ refeição

Tabela XVIII - Bioacessibilidade de patulina em amostras de sumos contaminados artificialmente, não fortificadas, com e sem refeição (maçã e 8 frutos, n=2)

Material em Estudo		Quantidade matriz (g)	Quantidade refeição controle (g)	Quantidade HCl/NaOH adicionada (ml)	Concent Digerido ug/kg	ug no volume total do quimo	Libertação (ug/kg matriz)	Concentração Total na Matriz (ug/kg matriz)	Bioacessibilidade (%)	Bioacessibilidade média (%)
1-1	Maçã + refeição	4,5213	4,4935		4,140	0,112	24,737	200,0	12,37	12
1-2		4,5324	4,6401		3,900	0,106	23,381	200,0	11,69	
1-3		4,4923	4,5481		11,960	0,323	71,991	400,0	18,00	
1-4		4,51	4,5576		12,120	0,328	72,740	400,0	18,19	
2-1	Maçã - refeição	4,5298		0,070	9,810	0,222	48,943	200,0	24,47	27
2-2		4,502		0,070	11,630	0,263	58,310	200,0	29,16	
2-3		4,4847		0,070	22,560	0,509	113,460	400,0	28,36	
2-4		4,4977		0,080	22,090	0,499	110,888	400,0	27,72	
3-1	8 Frutos + refeição	4,467	4,5257		3,930	0,106	23,748	200,0	11,87	12
3-2		4,5006	4,525		4,130	0,112	24,800	200,0	12,40	
3-3		4,4814	4,6385		12,120	0,329	73,346	400,0	18,34	
3-4		4,475	4,5851		15,710	0,425	94,998	400,0	23,75	
4-1	8 Frutos - refeição	4,4794		0,070	10,990	0,248	55,324	200,0	27,66	28
4-2		4,4816		0,040	10,950	0,247	55,028	200,0	27,51	
4-3		3,7368		0,040	30,510	0,664	177,802	400,0	44,45	
4-4		4,5435		0,040	25,050	0,566	124,511	400,0	31,13	

Recuperações:

Maçã com refeição:

Fortificação (µL)	200		200	200
Toma	1	2	Fortificada	Fortificada
Amostra (g/mL)	10	10	10	10
Área 1	0	0	0	0
Área 2	0	0	0	0
Média áreas	10273	9638	31227	31666
Solvente extracção (mL)	10	10	10	10
Volume obtido SPE (mL)	2,5	2,5	2,5	2,5
Água redissolução (mL)	1	1	1	1
Factor diluição sol fortif. (1:x)	10		10	10
Conc. (µg/L)	10,34	9,75	29,89	30,30
Conc. (µg/kg)	4,14	3,90	11,96	12,12
Factor diluição amostra (1:x)	1	1	1	1
Conc.c/diluição (µg/kg)	4,14	3,90	11,96	12,12
Media dos resultados (µg/kg)	4,02			
Recuperação (%)	39,7		40,3	
Conc. Corrigida (µg/kg)	10,42	9,82		
Conc. Média Corrigida (µg/kg)	10,12			

Maçã sem refeição:

Fortificação (µL)	200		200	200
Toma	1	2	Fortificada	Fortificada
Amostra (g/mL)	10	10	10	10
Área 1	0	0	0	0
Área 2	0	0	0	0
Média áreas	25483	30350	59633	58377
Solvente extracção (mL)	10	10	10	10
Volume obtido SPE (mL)	2,5	2,5	2,5	2,5
Água redissolução (mL)	1	1	1	1
Factor diluição sol fortif. (1:x)	10		10	10
Conc. (µg/L)	24,53	29,07	56,40	55,23
Conc. (µg/kg)	9,81	11,63	22,56	22,09
Factor diluição amostra (1:x)	1	1	1	1
Conc.c/diluição (µg/kg)	9,81	11,63	22,56	22,09
Media dos resultados (µg/kg)	10,72			
Recuperação (%)	59,2		56,6	
Conc. Corrigida (µg/kg)	16,58	19,65		
Conc. Média Corrigida (µg/kg)	18,11			

8 Frutos com refeição:

Fortificação (µL)	200		200	
Toma	1	2	Fortificada	Fortificada
Amostra (g/mL)	10	10	10	10
Área 1	0	0	0	0
Área 2	0	0	0	0
Média áreas	9712	10249	31869	41288
Solvente extracção (mL)	10	10	10	10
Volume obtido SPE (mL)	2,5	2,5	2,5	2,5
Água redissolução (mL)	1	1	1	1
Factor diluição sol fortif. (1:x)	10		10	
Conc. (µg/L)	9,81	10,32	30,49	39,28
Conc. (µg/kg)	3,93	4,13	12,20	15,71
Factor diluição amostra (1:x)	1	1	1	1
Conc.c/diluição (µg/kg)	3,93	4,13	12,20	15,71
Media dos resultados (µg/kg)	4,03			
Recuperação (%)	40,9		58,4	
Conc. Corrigida (µg/kg)				
Conc. Média Corrigida (µg/kg)				

8 Frutos sem refeição:

Fortificação (µL)	200		200	
Toma	1	2	Fortificada	Fortificada
Amostra (g/mL)	10	10	10	10
Área 1	0	0	0	0
Área 2	0	0	0	0
Média áreas	28644	28523	80936	66308
Solvente extração (mL)	10	10	10	10
Volume obtido SPE (mL)	2,5	2,5	2,5	2,5
Água redissolução (mL)	1	1	1	1
Factor diluição sol fortif. (1:x)	10		10	
Conc. (µg/L)	27,48	27,37	76,28	62,63
Conc. (µg/kg)	10,99	10,95	30,51	25,05
Factor diluição amostra (1:x)	1	1	1	1
Conc.c/diluição (µg/kg)	10,99	10,95	30,51	25,05
Media dos resultados (µg/kg)	10,97			
Recuperação (%)	97,7		70,4	
Conc. Corrigida (µg/kg)				
Conc. Média Corrigida (µg/kg)				

Tabela XIX - Taxa de recuperação de patulina em amostras de sumos fortificadas (n=2)

	Com refeição		Média	Sem refeição		Média
Turvo - Maça	39.7%	40.3%	40 %	59.2%	56.1%	58 %
Límpido - 8 frutos	40.9%	58.4%	50 %	97.7%	70.4%	84 %

Sample Set 23/01/2014 (ss140123PAT_Dig):

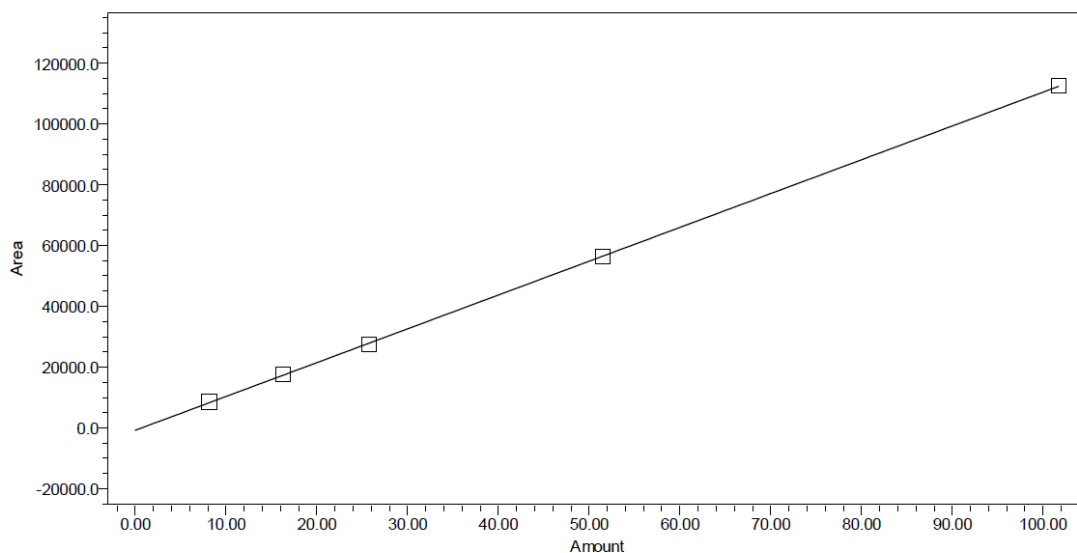
Vials	Solução	µL	Condição	Método	Tempo
1	Fase móvel	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
2	pH4	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
3	P8	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
4	P16	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
5	P25	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
6	P50	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
7	P100	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
8	1.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
9	1.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
10	1.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
11	1.4	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
12	2.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
13	2.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
14	2.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
15	2.4	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
16	3.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
17	3.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
18	3.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
19	3.4	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
20	4.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
21	4.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
22	4.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
23	4.4	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lavagem acetonitrilo2998_set	60

		Condition Column	Lav_AcetAgua_65%2998_set	30
		Condition Column	Paragem_Acet_Agua65%2998_set	10,1



LC Calibration Report

Processing Method:	290114PAT_Proc	System:	HPLC7a
Processing Method ID:	41267	Channel:	2998 Ch1 276nm@1.2nm
Calibration ID:	41277	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 276nm@1.2nm
Date Calibrated:	1/29/2014 12:18:30 PM Europe/Lisbon		



Peak Name: Patulina; RT: 12.170; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 41278; R: 0.999965; R²: 0.999931; Weighting: None; Equation: $Y = 1,11e+003 X - 7,85e+002$; Normalized Intercept/Slope: -0.012851; RSD(E): 0.907881

Peak: Patulina

	Sample Name	Result Id	Peak Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	S1 - 8	41283	Patulina		8.140	8556.575	8.399	-3.08	No	No
2	S2 - 16	41282	Patulina		16.270	17577.987	16.509	-1.45	No	No
3	S3 - 25	41281	Patulina		25.760	27389.800	25.331	1.70	No	No
4	S4 - 50	41280	Patulina		51.530	56264.925	51.291	0.47	No	No
5	S5 - 100	41279	Patulina		101.700	112525.050	101.871	-0.17	No	No

Reported by User: Maria João Barreira (Mjbarreira)
 Report Method: LC Calibration Report
 Report Method ID 1015
 Page: 1 of 1

Project Name: Patulina
 Date Printed:
 1/29/2014
 12:41:54 PM Europe/Lisbon

III- Determinação da bioacessibilidade de patulina em sumos de fruta contaminados artificialmente com e sem refeição (guisado de borrego)

Amostras analisadas em triplicado (8 frutos. Tropical, maçã, maçã-cenoura; três com refeição e 3 sem refeição), contaminadas previamente com 200 µg/kg de patulina.

Correspondência de amostras:

1.1/1.2/1.3	8 frutos c/ refeição	5.1/5.2/5.3	Maçã c/ refeição
2.1/2.2/2.3	8 frutos s/ refeição	6.1/6.2/6.3	Maçã s/ refeição
3.1/3.2/3.3	Tropical c/ refeição	7.1/7.2/7.3	Tropical c/ refeição
4.1/4.2/4.3	Tropical s/ refeição	8.1/8.2/8.3	Tropical s/ refeição

Tabela XX- Bioacessibilidade de patulina em sumos de fruta contaminados artificialmente na presença e ausência de refeição

Material em Estudo		Quantidade matriz (g)	Quantidade refeição controle (g)	Quantidade HCl/NaOH adicionada	Concent Digerido ug/kg	ug no volume total do quimo	Libertação (ug/kg matriz)	Concentração Total na Matriz (ug/kg matriz)	Bioacessibilidade (%)
1-1	8 Frutos	4,4561	4,61		5,370	0,145	32,617	200,0	16,31
1-2		4,487	4,6912		5,800	0,158	35,131	200,0	17,57
1-3		4,5368	4,6678		4,650	0,127	27,883	200,0	13,94
2-1		4,5006		0,100	9,310	0,210	46,752	200,0	23,38
2-2		4,5027		0,100	10,200	0,231	51,202	200,0	25,60
2-3		4,5079		0,100	5,700	0,129	28,586	200,0	14,29
3-1	Tropical	4,4629	4,7148		4,010	0,109	24,420	200,0	12,21
3-2		4,5052	4,6319		5,510	0,150	33,190	200,0	16,59
3-3		4,4832	4,6104		4,420	0,120	26,712	200,0	13,36
4-1		4,4979		0,06	7,040	0,159	35,307	200,0	17,65
4-2		4,5113		0,06	9,960	0,225	49,833	200,0	24,92
4-3		4,5214		0,06	9,470	0,214	47,296	200,0	23,65
5-1	Maçã	4,497	4,6829		6,070	0,165	36,687	200,0	18,34
5-2		4,525	4,6091		7,420	0,201	44,494	200,0	22,25
5-3		4,5362	4,4385		6,750	0,182	40,139	200,0	20,07
6-1		4,5898		0,08	8,990	0,204	44,403	200,0	22,20
6-2		4,5287		0,08	10,370	0,234	51,770	200,0	25,89
6-3		4,4888		0,08	9,690	0,219	48,719	200,0	24,36
7-1	Maçã-cenoura	4,5208	4,5134		6,530	0,177	39,049	200,0	19,52
7-2		4,5116	4,5415		7,600	0,206	45,572	200,0	22,79

Simulação in vitro do processo digestivo de patulina em sumos de fruta

7-3	Sem refeição	4,612	4,7375	1,510	0,041	8,954	200,0	4,48
8-1		4,5633	0,08	0,530	0,012	2,630	200,0	1,31
8-2		4,5489	0,08	11,12	0,252	55,317	200,0	27,66
8-3		4,5212	0,08	10,64	0,240	53,189	200,0	26,59

Sample Set 14-02-10 (SS140210PAT_DIG):

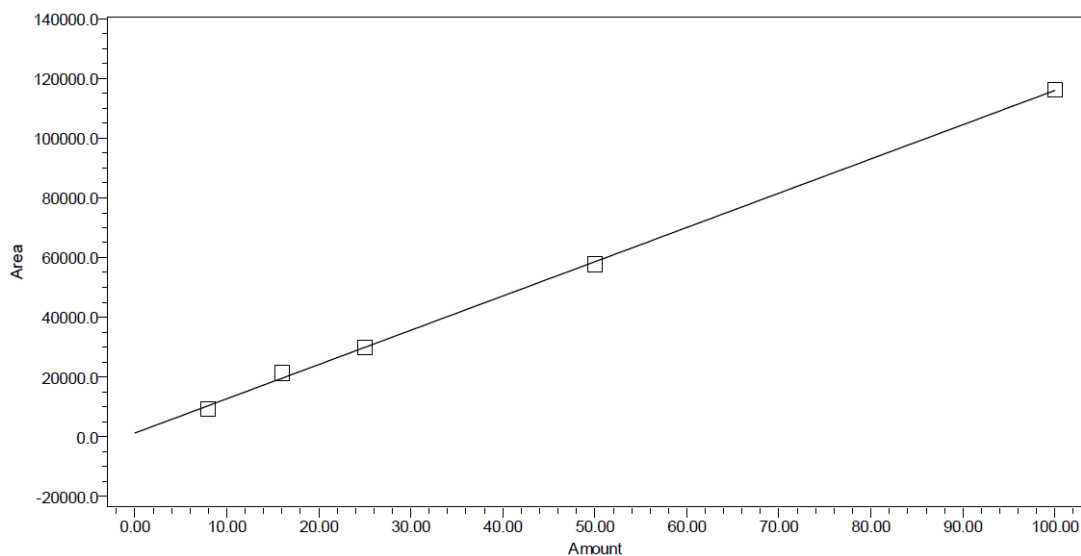
Vials	Solução	μL	Condição	Método	Tempo
1	pH4	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
2	P8	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
3	P16	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
4	P25	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
5	P50	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
6	P100	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
7	1.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
8	1.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
9	1.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
10	2.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
11	2.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
12	2.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
13	3.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
14	3.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
15	3.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
16	4.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
17	4.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
18	4.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
19	5.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
20	5.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
21	5.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
22	6.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
23	6.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
24	6.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15

			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
25	7.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
26	7.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
27	7.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
28	8.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
29	8.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
30	8.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
31	9.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
32	9.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
			Condition Column	Lavagem acetoniitrilo2998_set	60
			Condition Column	Lav_AcetAgua_65%2998_set	30
			Condition Column	Paragem_Acet_Agua65%2998_set	10,1



LC Calibration Report

Processing Method:	120214OPAT_Proc	System:	HPLC7a
Processing Method ID:	41469	Channel:	2998 Ch1 276nm@1.2nm
Calibration ID:	43443	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 276nm@1.2nm
Date Calibrated:	5/19/2014 10:40:37 AM Europe/Lisbon		



Peak Name: Patulina; RT: 12.156; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 43444; R: 0.999631; R²: 0.999263; Weighting: None; Equation: $Y = 1,15e+003 X + 1,26e+003$; Normalized Intercept/Slope: 0.020354; RSD(E): 2.850250

Peak: Patulina

	Sample Name	Result Id	Peak Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	S1 - 8	43445	Patulina		8.000	9263.450	6.979	14.64	No	No
2	S2 - 16	43446	Patulina		16.000	21376.150	17.541	-8.78	No	No
3	S3 - 25	43447	Patulina		25.000	29985.200	25.048	-0.19	No	No
4	S4 - 50	43448	Patulina		50.000	57703.300	49.218	1.59	No	No
5	S5 - 100	43449	Patulina		100.000	116184.200	100.214	-0.21	No	No

Reported by User: Maria João Barreira (Mjbarreira)
 Report Method: LC Calibration Report
 Report Method ID 1015
 Page: 1 of 1

Project Name: Patulina
 Date Printed:
 5/19/2014
 10:46:12 AM Europe/Lisbon

IV- Quantificação da PAT em sumos de fruta contaminados artificialmente

Amostras analisadas em duplicado, contaminadas previamente com 200 µg/kg de patulina (Maçã, Maçã-Cenoura, 8 frutos, Tropical)

Tabela XXI - Quantificação patulina em amostras de sumos (8 frutos, tropical, maçã, maçã-cenoura)

	Sumo 9 Toma 1	Sumo 9 Toma 2	Sumo 10 Toma 1	Sumo 10 Toma 2	Sumo 11 Toma 1	Sumo 11 Toma 2	Sumo 12 Toma 1	Sumo 12 Toma 2
Área	294222	297988	302853	294992	309612	313398	361727	376644
[µg/L]	275,31	278,83	283,37	276,03	289,67	293,21	338,31	352,23
[µg/kg]	110,12	111,53	113,35	110,41	115,87	117,28	135,32	140,89

Para uma contaminação inicial de 200 µg/kg:

Recuperação % = ([obtida]*100)/[inicial (200)]; Diferença % = 100 – Recuperação %

Tabela XXII - Taxa de recuperação de patulina em amostras de sumos

	9.1	9.2	10.1	10.2	11.1	11.2	12.1	12.2
[µg/kg]	110,12	111,53	113,35	110,41	115,87	117,28	135,32	140,89
Recuperação %	55,06	55,765	56,675	55,205	57,935	58,64	67,66	70,445
Média Rec %	55,4125		55,94		58,2875		69,0525	
Diferença %	44,94	44,235	43,325	44,795	42,065	41,36	32,34	29,555
Média Dife %	44,5875		44,06		41,7125		30,9475	

Correspondência de amostras:

9.1/9.2	8 frutos	11.1/11.2	Maçã
10.1/10.2	Tropical	12.1/12.2	Maçã-cenoura

Sample Set 14-02-10 (SS140210PAT_DIG):

Vials	Solução	µL	Condição	Método	Tempo
1	Fase móvel	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
2	pH4	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
3	P8	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
4	P16	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
5	P25	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
6	P50	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
7	P100	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
41	10.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
42	10.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
43	11.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
44	11.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
45	12.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
46	12.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
			Condition Column	Lavagem acetonitrilo2998_set	60
			Condition Column	Lav_AcetAgua_65%2998_set	30
			Condition Column	Paragem_Acet_Agua65%2998_set	10,1

V- Simulação da digestão infantil *in vitro* no estudo de Bioacessibilidade de Patulina (PAT) em sumos de frutas contaminados artificialmente

Foram analisados 4 sumos contaminados artificialmente com 200 µg/Kg de PAT e digeridos na presença e ausência de refeição.

Correspondência de amostras:

13.1/13.2/13.3	8 Frutos c/ refeição	17.1/17.2/17.3	Maçã c/ refeição
14.1/14.2/14.3	8 Frutos s/ refeição	18.1/18.2/18.3	Maçã s/ refeição
15.1/15.2/15.3	Tropical c/ refeição	19.1/19.2/19.3	Maçã-cenoura c/ refeição
16.1/16.2/16.3	Tropical s/ refeição	20.1/20.2/20.3	Maçã-cenoura s/ refeição

Tabela XXIII- Bioacessibilidade de patulina em sumos de fruta (8 frutos, tropical, maçã, maçã-cenoura) com recurso ao modelo de digestão *in vitro* infantil, com e sem refeição (n=3)

Material em Estudo		Quantidade matriz (g)	Quantidade refeição controle (g)	Quantidade HCl/NaOH adicionada (ml)	Concent Digerido ug/kg	ug no volume total do quimo	Libertação (ug/kg matriz)	Concentração Total na Matriz (ug/kg matriz)	Bioacessibilidade de (%)	Bioacessibilidade de média (%)
13-1	8 Frutos	4,527	4,639	0,030	1,42	0,0	8,530	200,0	4,26	4
		9	8		0	39				
13-2		4,642	4,574	0,030	1,22	0,0	7,160	200,0	3,58	
		3	1		0	33				
13-3		4,506	4,506	0,030	1,08	0,0	6,481	200,0	3,24	
		7	1		0	29				
14-1	8 Frutos	4,502		0,050	2,05	0,0	10,26	200,0	5,13	6
		7			0	46	8			
14-2		4,496		0,050	2,53	0,0	12,68	200,0	6,34	
		9			0	57	5			
14-3	8 Frutos	4,503		0,050	2,40	0,0	12,02	200,0	6,01	
		1			0	54	0			
15-1		4,545	4,692	0,020	1,31	0,0	7,855	200,0	3,93	3
	Tropical	8	6		0	36				
15-2		4,525	4,671	0,020	0,95	0,0	5,713	200,0	2,86	
		8	1		0	26				
15-3	Tropical	4,488	4,528	0,020	0,69	0,0	4,156	200,0	2,08	
		7	4		0	19				
16-1		4,507		0,040	2,15	0,0	10,75	200,0	5,38	5
		6			0	48	5			
16-2		4,502		0,040	2,15	0,0	10,76	200,0	5,38	
		7			0	48	4			
16-3		4,530		0,040	2,21	0,0	11,01	200,0	5,51	
	Maça	4			0	50	0			
17-1		4,588	4,660	0,050	3,71	0,1	22,07	200,0	11,04	14
	Maça	9	1		0	01	0			
17-2		4,527	4,593	0,040	4,91	0,1	29,45	200,0	14,73	
		9	5		0	33	3			

Simulação in vitro do processo digestivo de patulina em sumos de fruta

17-3		4,519	4,638	0,050	4,99	0,1	30,04	200,0	15,02	
			2		0	36	3			
18-1	Sem refeição	4,532		0,040	2,56	0,0	12,75	200,0	6,37	7
		3			0	58	0			
18-2		4,561		0,040	3,24	0,0	16,05	200,0	8,03	
		6			0	73	3			
18-3	Sem refeição	4,514		0,040	2,77	0,0	13,83	200,0	6,92	11
		5			0	62	9			
19-1		4,530	4,682	0,020	3,92	0,1	23,56	200,0	11,78	
		7	8		0	07	3			
19-2	Com refeição	4,523	4,498	0,020	3,17	0,0	18,95	200,0	9,48	8
		4	9		0	86	1			
19-3		4,516	4,517	0,020	3,46	0,0	20,72	200,0	10,36	
		6	3		0	94	5			
20-1	Sem refeição	4,510		0,010	3,26	0,0	16,27	200,0	8,14	8
		5			0	73	7			
20-2		4,525		0,010	2,83	0,0	14,09	200,0	7,05	
		9			0	64	1			
20-3	Sem refeição	4,509		0,010	3,11	0,0	15,53	200,0	7,77	2
					0	70	2			

Sample Set 12-02-2014 (SS140212PAT_DigInf):

Vials	Solução	µL	Condição	Método	Tempo
1	Fase móvel	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
2	pH4	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
3	P8	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
4	P16	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
5	P25	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
6	P50	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
7	P100	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
8	13.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
9	13.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
10	13.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
11	14.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
12	14.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
13	14.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
14	15.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
15	15.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
16	15.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
17	16.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
18	16.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30

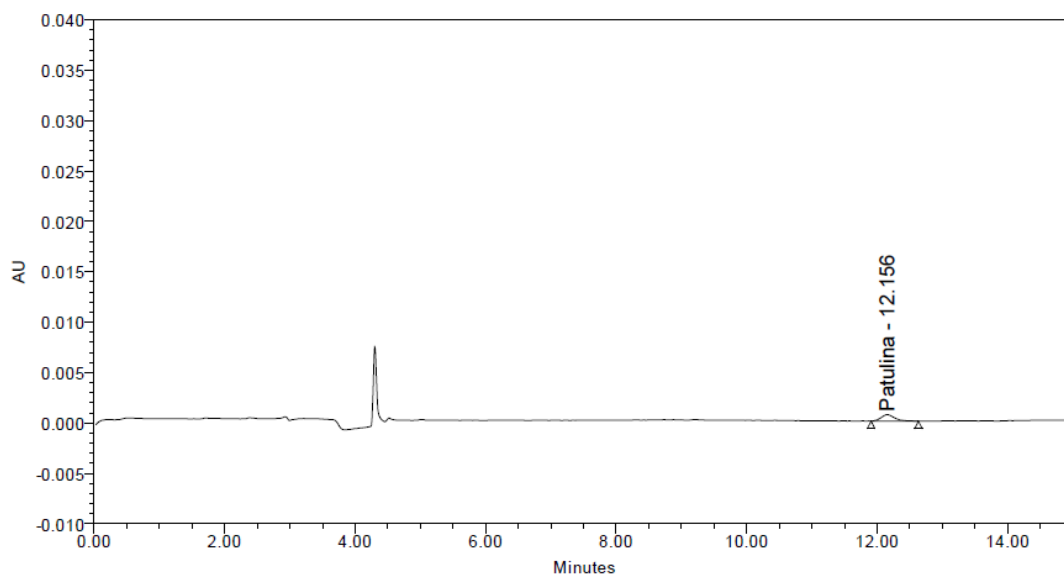
19	16.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
20	17.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
21	17.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
22	17.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
23	18.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
24	18.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
25	18.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
26	19.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
27	19.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
28	19.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
29	20.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
30	20.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
31	20.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lavagem acetoniitrilo2998_set	60
			Condition Column	Lav_AcetAgua_65%2998_set	30
			Condition Column	Paragem_Acet_Agua65%2998_set	10,1



Rep Injection Report_Pat2998

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	S1 - 8	Acquired By:	Mjbarreira
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	SS140210PAT_DIG
Vial:	3	Acq. Method Set:	Patulina2998_set
Injection #:	1	Processing Method	120214OPAT_Proc
Injection Volume:	200.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 276nm@1.2nm
Run Time:	15.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 276nm@1.2nm
Date Acquired: 2/10/2014 5:42:14 PM Europe/Lisbon			
Date Processed: 2/12/2014 3:59:52 PM Europe/Lisbon			



Name: Patulina

	Name	Retention Time (min)	Area (μV*sec)	% Area	Height (μV)	Int Type	Amount	Units	Peak Type
1	Patulina	12.156	9263.45002	100.00	640.77661	BB	8.000	ug/L	Found

Reported by User: Maria João Barreira (Mjbarreira)
 Report Method: Rep Injection Report_Pat2998
 Report Method ID 41736
 Page: 1 of 3

Project Name: Patulina
 Date Printed: 2/17/2014
 11:15:40 AM Europe/Lisbon

VI- Ensaio de recuperação de patulina em amostras digeridas com e sem refeição (guisado de borrego) com adição de pectinase

Amostras contaminadas inicialmente com 200 µg/kg de patulina (Maçã e 8 Frutos), adição de pectinase antes da extração e fortificação após a digestão com e sem refeição com 20 µg/kg de patulina (4 amostras com refeição, 4 sem para cada sumo, dois de cada fortificados) (n=2)

Correspondência de amostras:

5.1/5.2	Maçã c/ refeição	7.1/7.2	8 Frutos c/ refeição
6.1/6.2	Maçã s/ refeição	8.1/8.2	8 Frutos s/ refeição

Tabela XXIV - Taxa de recuperação de patulina em amostras fortificadas na presença e ausência de refeição (n=2)

	Com refeição		Média	Sem refeição		Média
Maçã	45.2%	32.3%	38.75%	63.7%	44.2%	53.95%
8 Frutos	75.3%	45.1%	60.02%	35.8%	48.4%	42.1%

Recuperações:

8 Frutos com refeição

Fortificação (µL)				200	200
Toma		1	2	Fortificada	Fortificada
Amostra (g/mL)		10	10	10	10
Área 1		0	0	0	0
Área 2		0	0	0	0
Média áreas		9033	15712	52729	36534
Solvente extração (mL)		10	10	10	10
Volume obtido SPE (mL)		2,5	2,5	2,5	2,5
Água redissolução (mL)		1	1	1	1
Factor diluição sol fortif. (1:x)				10	10
Conc. (µg/L)		9,18	15,41	49,96	34,84
Conc. (µg/kg)		3,67	6,17	19,98	13,94
Factor diluição amostra (1:x)		1	1	1	1
Conc.c/diluição (µg/kg)		3,67	6,17	19,98	13,94
Media dos resultados (µg/kg)		4,92			
Recuperação (%)				75,3	45,1
Conc. Corrigida (µg/kg)					
Conc. Média Corrigida (µg/kg)					

Simulação in vitro do processo digestivo de patulina em sumos de fruta

8 Frutos sem refeição:

Fortificação (µL)				200	200
Toma		1	2	Fortificada	Fortificada
Amostra (g/mL)		10	10	10	10
Área 1		0	0	0	0
Área 2		0	0	0	0
Média áreas		10461	10151	29482	36244
Solvente extracção (mL)		10	10	10	10
Volume obtido SPE (mL)		2,5	2,5	2,5	2,5
Água redissolução (mL)		1	1	1	1
Factor diluição sol fortif. (1:x)				10	10
Conc. (µg/L)		10,51	10,22	28,26	34,57
Conc. (µg/kg)		4,21	4,09	11,31	13,83
Factor diluição amostra (1:x)		1	1	1	1
Conc.c/diluição (µg/kg)		4,21	4,09	11,31	13,83
Media dos resultados (µg/kg)		4,15			
Recuperação (%)				35,8	48,4
Conc. Corrigida (µg/kg)					
Conc. Média Corrigida (µg/kg)					

Maçã com refeição:

Fortificação (µL)				200	200
Toma		1	2	Fortificada	Fortificada
Amostra (g/mL)		10	10	10	10
Área 1		0	0	0	0
Área 2		0	0	0	0
Média áreas		6297	6857	30779	23905
Solvente extracção (mL)		10	10	10	10
Volume obtido SPE (mL)		2,5	2,5	2,5	2,5
Água redissolução (mL)		1	1	1	1
Factor diluição sol fortif. (1:x)				10	10
Conc. (µg/L)		6,63	7,15	29,47	23,06
Conc. (µg/kg)		2,65	2,86	11,79	9,22
Factor diluição amostra (1:x)		1	1	1	1
Conc.c/diluição (µg/kg)		2,65	2,86	11,79	9,22
Media dos resultados (µg/kg)		2,76			
Recuperação (%)				45,2	32,3
Conc. Corrigida (µg/kg)		5,87	6,33		
Conc. Média Corrigida (µg/kg)		6,10			

Maça sem refeição:

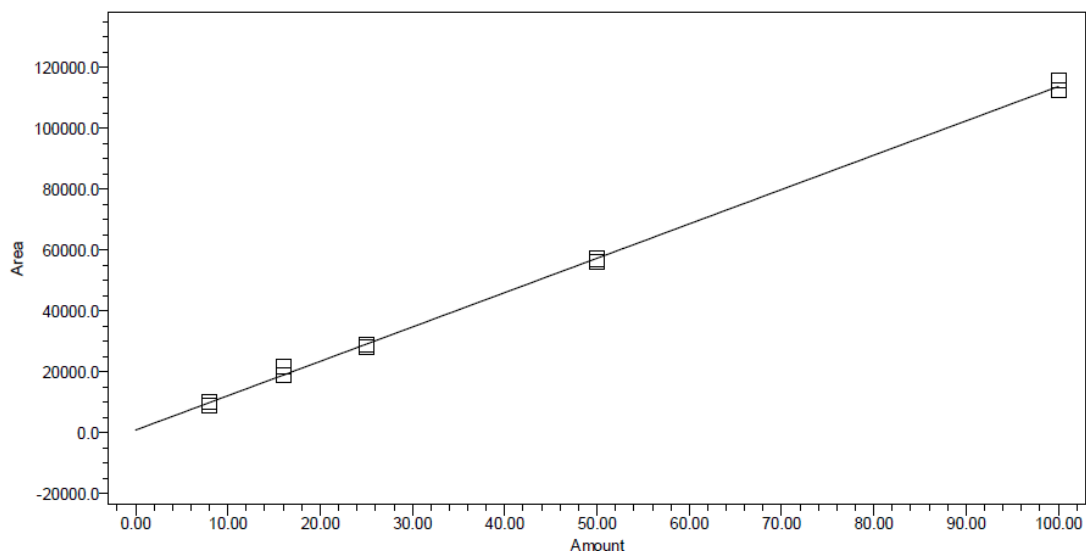
Fortificação (µL)				200	200
Toma		1	2	Fortificada	Fortificada
Amostra (g/mL)		10	10	10	10
Área 1		0	0	0	0
Área 2		0	0	0	0
Média áreas		6428	13212	43955	33480
Solvente extração (mL)		10	10	10	10
Volume obtido SPE (mL)		2,5	2,5	2,5	2,5
Água redissolução (mL)		1	1	1	1
Factor diluição sol fortif. (1:x)				10	10
Conc. (µg/L)		6,75	13,08	41,77	31,99
Conc. (µg/kg)		2,70	5,23	16,71	12,80
Factor diluição amostra (1:x)		1	1	1	1
Conc.c/diluição (µg/kg)		2,70	5,23	16,71	12,80
Media dos resultados (µg/kg)		3,97			
Recuperação (%)				63,7	44,2
Conc. Corrigida (µg/kg)		4,24	8,21		
Conc. Média Corrigida (µg/kg)		6,23			

Sample Set 20-03-2014 (SS140320Pat_Dig):

1	Fase móvel	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
2	pH4	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
3	P8	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
4	P16	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
5	P25	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
6	P50	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
7	P100	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
8	5.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
9	5.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
10	5.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
11	5.4	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
12	6.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
13	6.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
14	6.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
15	6.4	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
16	7.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30

17	7.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
18	7.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
19	7.4	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
20	8.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
21	8.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
22	8.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
23	8.4	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lavagem acetoneitrilo2998_set	60
			Condition Column	Lav_AcetAgua_65%2998_set	30
			Condition Column	Paragem_Acet_Agua65%2998_set	10,1

Processing Method:	210312PAT_Proc	System:	HPLC7a
Processing Method ID:	37433	Channel:	2998 Ch1 276nm@1.2nm
Calibration ID:	42549	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 276nm@1.2nm
Date Calibrated:	3/21/2014 9:54:45 AM Europe/Lisbon		



Peak Name: Patulina; RT: 12.610; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 42550; R: 0.999442; R²: 0.998885; Weighting: None; Equation: $Y = 1,13e+003 X + 9,37e+002$; Normalized Intercept/Slope: 0.015384; RSD(E): 3.056036

Peak: Patulina

	Sample Name	Result Id	Peak Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	S1 - 8	37445	Patulina		8.000	10022.800	8.057	-0.71	No	No
2	S1 - 8	42551	Patulina		8.000	9123.051	7.259	10.21	No	No
3	S2 - 16	37446	Patulina		16.000	18999.150	16.016	-0.10	No	No
4	S2 - 16	42552	Patulina		16.000	21723.375	18.432	-13.19	No	No
5	S3 - 25	37447	Patulina		25.000	28079.300	24.068	3.87	No	No
6	S3 - 25	42553	Patulina		25.000	28978.550	24.866	0.54	No	No
7	S4 - 50	37448	Patulina		50.000	56085.025	48.902	2.25	No	No
8	S4 - 50	42554	Patulina		50.000	57146.600	49.843	0.31	No	No

Reported by User: Maria João Barreira (Mjbarreira)
Report Method: LC Calibration Report
Report Method ID 1015
Page: 1 of 2

Project Name: Patulina
Date Printed: 3/21/2014
10:04:48 AM Europe/Lisbon

VII- Ensaio de digestão de amostras artificialmente contaminadas com patulina com e sem refeição (bolacha maria)

Amostras contaminadas inicialmente com 200 µg/kg de patulina (8 Frutos, Tropical, Maçã e Maçã-cenoura) com e sem refeição, bolacha maria (n=3)

Correspondência de amostras:

21.1/21.2/21.3	8 Frutos c/ refeição	25.1/25.2/25.3	Maçã c/ refeição
22.1/22.2/22.3	8 Frutos s/ refeição	26.1/26.2/26.3	Maçã s/ refeição
23.1/23.2/23.3	Tropical c/ refeição	27.1/27.2/27.3	Maçã-cenoura c/ refeição
24.1/24.2/24.3	Tropical s/ refeição	28.1/28.2/28.3	Maçã-cenoura s/ refeição

Tabela XXV - Bioacessibilidade de patulina em sumos de fruta artificialmente contaminados na presença e ausência de refeição, bolacha maria (n=3)

Material em Estudo	Quantidade matriz (g)	Quantidade refeição controle (g)	Quantidade HCl/NaOH adicionada (ml)	Concent Digerido ug/kg	ug no volume total do quimo	Libertação (ug/kg matriz)	Concentração Total na Matriz (ug/kg matriz)	Bioacessibilidade ^e (%)	Bioacessibilidade ^e média (%)
21-1	4,5665	4,5876		4,090	0,111	24,321	200,0	12,16	9
21-2	4,5145	4,5108		1,740	0,047	10,416	200,0	5,21	
21-3	4,52	4,502		3,310	0,089	19,788	200,0	9,89	
22-1	4,5935		0,075	10,030	0,227	49,497	200,0	24,75	21
22-2	4,538		0,080	0,360	0,008	1,794	200,0	0,90	
22-3	4,5139		0,075	7,270	0,164	36,381	200,0	18,19	
23-1	4,5183	4,5245	0,015	3,310	0,090	19,822	200,0	9,91	9
23-2	4,5134	4,5102		2,020	0,055	12,095	200,0	6,05	
23-3	4,5191	4,5049		3,370	0,091	20,152	200,0	10,08	
24-1	4,5227		0,015	5,640	0,127	28,105	200,0	14,05	11
24-2	4,5712		0,015	5,870	0,133	29,004	200,0	14,50	
24-3	4,5457		0,015	1,380	0,031	6,849	200,0	3,42	
25-1	4,5456	4,5144		0,000	0,000	0,000	200,0	missi ng	11
25-2	4,555	4,5035		3,350	0,091	19,900	200,0	9,95	
25	4,51	4,5258	0,01	4,320	0,117	25,911	200,0	12,96	

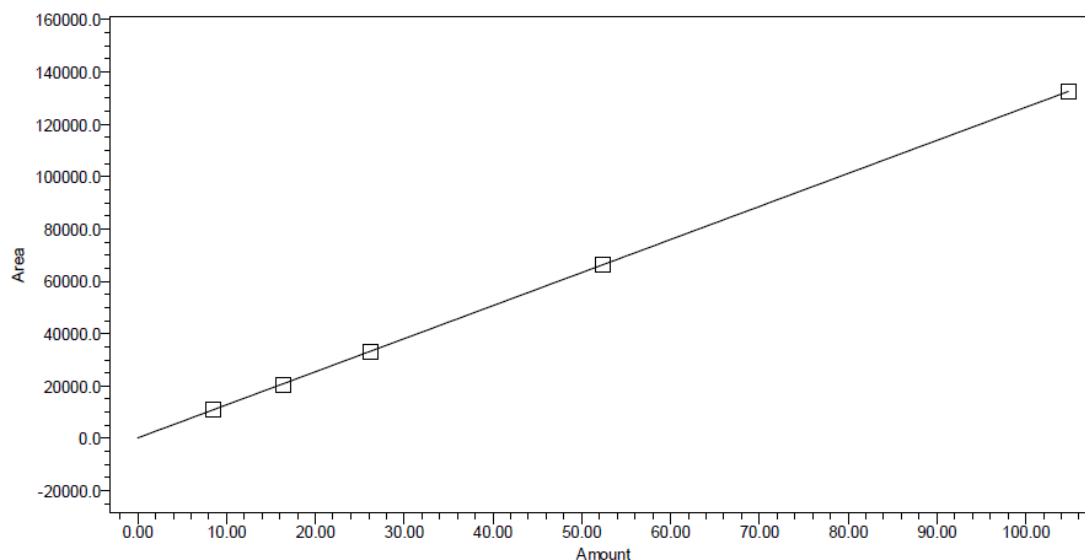
-3			5						
26		4,5142	0,07	9,210	0,208	46,087	200,0	23,04	17
-1			5						
26		4,5255	0,07	7,550	0,171	37,705	200,0	18,85	
-2			5						
26		4,5349	0,07	3,840	0,087	19,145	200,0	9,57	
-3			5						
27		4,5052	4,5645	3,470	0,094	20,850	200,0	10,42	10
-1									
27		4,5052	4,5486	0,01	28,61	171,89	200,0	85,95	
-2			5	0	0,774	9			
27		4,5323	4,5103	2,990	0,081	17,840	200,0	8,92	
-3									
28		4,5342	0,07	5,830	0,132	29,071	200,0	14,54	16
-1			5						
28		4,5748	0,06	5,830	0,132	28,845	200,0	14,42	
-2			0						
28		4,5495	0,06	8,190	0,185	40,702	200,0	20,35	
-3			0						

Sample Set 26-03-2014 (SS140326PAT_Dig):

1	Fase móvel	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
2	pH4	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
8	21.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
9	21.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
10	21.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
11	22.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
12	22.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
13	22.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
14	23.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
15	23.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
16	23.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
17	24.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
18	24.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
19	24.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
20	25.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
21	25.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15

			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
22	25.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
23	26.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
24	26.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
25	26.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
26	27.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
27	27.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
28	27.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
29	28.1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
30	28.2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
31	28.3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
			Condition Column	Lavagem acetonitrilo2998_set	60
			Condition Column	Lav_AcetAgua_65%2998_set	30
			Condition Column	Paragem_Acet_Agua65%2998_set	10,1

Processing Method:	140325PAT_Proc	System:	HPLC7a
Processing Method ID:	42694	Channel:	2998 Ch1 276nm@1.2nm
Calibration ID:	42707	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 276nm@1.2nm
Date Calibrated:	3/26/2014 11:00:59 AM Europe/London		



Peak Name: Patulina; RT: 12.190; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 42708; R: 0.999993; R²: 0.999985; Weighting: None; Equation: $Y = 1,26e+003 X + 1,61e+002$; Normalized Intercept/Slope: 0.002247; RSD(E): 0.411850

Peak: Patulina

	Sample Name	Result Id	Peak Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	S1 - 8	42709	Patulina		8.510	11154.200	8.700	-2.19	No	No
2	S2 - 16	42716	Patulina		16.370	20583.650	16.163	1.28	No	No
3	S3 - 25	42717	Patulina		26.190	33184.700	26.136	0.21	No	No
4	S4 - 50	42718	Patulina		52.390	66461.625	52.471	-0.16	No	No
5	S5 - 100	42719	Patulina		104.770	132531.174	104.760	0.01	No	No

Reported by User: Maria João Barreira (Mjbarreira)
 Report Method: LC Calibration Report
 Report Method ID 1015
 Page: 1 of 1

Project Name: Patulina
 Date Printed:
 3/28/2014
 11:27:54 AM Europe/Lisbon

VIII – Ensaio de recuperação e quantificação de patulina

Para o ensaio de recuperação foram analisados 2 sumos contaminados artificialmente com 200µg/kg PAT em quadruplicado digeridos com e sem refeição e fortificados com 20µg/Kg de PAT.

Para o ensaio de quantificação foram analisados 4 sumos em duplicado contaminados artificialmente com 200µg/kg PAT sem refeição.

Correspondência de amostras:

B1/B2/B3/B4	8 Frutos c/ refeição	CM1/CM2/CM3/CM4	Maçã c/ refeição
B5/B6/B7/B8	8 Frutos s/ refeição	CM5/CM6/CM7/CM4	Maçã s/ refeição
T1/T2	Tropical	CCM1/CCM2	Maçã-cenoura

8 Frutos com refeição:

Fortificação (µL)				200	200
Toma	1	2	Fortificada	Fortificada	
Amostra (g/mL)	10	10	10	10	
Área 1	0	0	0	0	
Área 2	0	0	0	0	
Média áreas	156787	169041	171031	161732	
Solvente extracção (mL)	10	10	10	10	
Volume obtido SPE (mL)	2,5	2,5	2,5	2,5	
Água redissolução (mL)	1	1	1	1	
Factor diluição sol fortif. (1:x)			10	10	
Conc. (µg/L)	147,06	158,50	160,35	151,68	
Conc. (µg/kg)	58,82	63,40	64,14	60,67	
Factor diluição amostra (1:x)	1	1	1	1	
Conc.c/diluição (µg/kg)	58,82	63,40	64,14	60,67	
Media dos resultados (µg/kg)	61,11				
Recuperação (%)			25,2	-3,7	
Conc. Corrigida (µg/kg)					
Conc. Média Corrigida (µg/kg)					

8 Frutos sem refeição:

Fortificação (µL)				200	200
Toma		1	2	Fortificada	Fortificada
Amostra (g/mL)		10	10	10	10
Área 1		0	0	0	0
Área 2		0	0	0	0
Média áreas		300348	313446	343681	223374
Solvente extracção (mL)		10	10	10	10
Volume obtido SPE (mL)		2,5	2,5	2,5	2,5
Água redissolução (mL)		1	1	1	1
Factor diluição sol fortif. (1:x)				10	10
Conc. (µg/L)		281,03	293,25	321,47	209,20
Conc. (µg/kg)		112,41	117,30	128,59	83,68
Factor diluição amostra (1:x)		1	1	1	1
Conc.c/diluição (µg/kg)		112,41	117,30	128,59	83,68
Media dos resultados (µg/kg)		114,86			
Recuperação (%)				68,7	-155,9
Conc. Corrigida (µg/kg)					
Conc. Média Corrigida (µg/kg)					

Maça com refeição:

Fortificação (µL)				200	200
Toma		1	2	Fortificada	Fortificada
Amostra (g/mL)		10	10	10	10
Área 1		0	0	0	0
Área 2		0	0	0	0
Média áreas		154390	170246	202677	199369
Solvente extracção (mL)		10	10	10	10
Volume obtido SPE (mL)		2,5	2,5	2,5	2,5
Água redissolução (mL)		1	1	1	1
Factor diluição sol fortif. (1:x)				10	10
Conc. (µg/L)		144,82	159,62	189,88	186,80
Conc. (µg/kg)		57,93	63,85	75,95	74,72
Factor diluição amostra (1:x)		1	1	1	1
Conc.c/diluição (µg/kg)		57,93	63,85	75,95	74,72
Media dos resultados (µg/kg)		60,89			
Recuperação (%)				125,5	115,2
Conc. Corrigida (µg/kg)		46,14	50,86		
Conc. Média Corrigida (µg/kg)		48,50			

Maça sem refeição:

Simulação in vitro do processo digestivo de patulina em sumos de fruta

Fortificação (µL)				200	200
Toma		1	2	Fortificada	Fortificada
Amostra (g/mL)		10	10	10	10
Área 1		0	0	0	0
Área 2		0	0	0	0
Média áreas		349864	330298	365211	288726
Solvente extracção (mL)		10	10	10	10
Volume obtido SPE (mL)		2,5	2,5	2,5	2,5
Água redissolução (mL)		1	1	1	1
Factor diluição sol fortif. (1:x)				10	10
Conc. (µg/L)		327,24	308,98	341,56	270,18
Conc. (µg/kg)		130,89	123,59	136,62	108,07
Factor diluição amostra (1:x)		1	1	1	1
Conc.c/diluição (µg/kg)		130,89	123,59	136,62	108,07
Media dos resultados (µg/kg)		127,24			
Recuperação (%)				46,9	-95,8
Conc. Corrigida (µg/kg)		279,08	263,51		
Conc. Média Corrigida (µg/kg)		271,30			

Recuperação:

Amostra	Contaminação artificial inicial (µg/Kg)	Concentração Média (µg/Kg)	Taxa Recuperação(%)
8 Frutos	200	114,855	57,4275
Tropical	200	111,53	55,765
Maçã	200	127,24	63,62
Maçã-Cenoura	200	144,2	72,1

Sample Set 12-05-2014 (SS140512Pat_Rec):

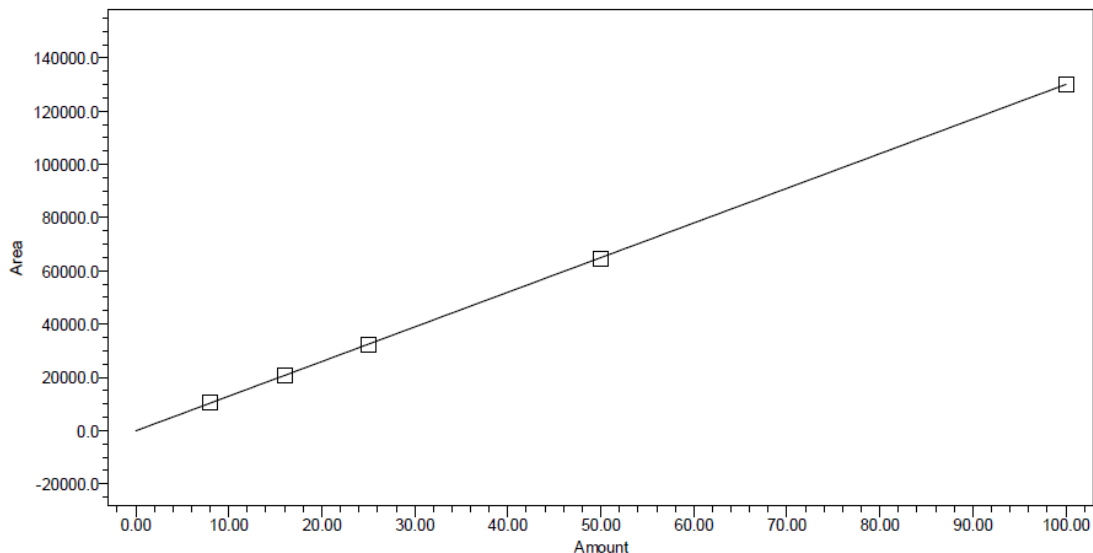
1	Fase móvel	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
2	pH4	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
3	P8	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
4	P16	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15

5	P25	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
6	P50	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
7	P100	200.0	Inject Standards	Patulina2998_set	15
8	Cont Fort	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
9	B1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
10	B2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
11	B3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
12	B4	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
13	B5	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
14	B6	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
15	B7	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
16	B8	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
17	CM1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
18	CM2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
19	CM3	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
20	CM4	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
21	CM5	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
22	CM6	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
23	CM7	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
24	CM8	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
25	T1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
26	T2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
27	CCM1	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lav_entre_am_Acet_Agua2998_set	30
28	CCM2	200.0	Inject Samples	Patulina2998_set	15
			Condition Column	Lavagem acetonitrilo2998_set	60
			Condition Column	Lav_AcetAgua_65%2998_set	30
			Condition Column	Paragem_Acet_Agua65%2998_set	10,1



LC Calibration Report

Processing Method:	130514Pat_Proc	System:	HPLC7a
Processing Method ID:	43403	Channel:	2998 Ch1 276nm@1.2nm
Calibration ID:	43413	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 276nm@1.2nm
Date Calibrated:	5/13/2014 1:49:06 PM Europe/Lisbon		



Peak Name: Patulina; RT: 12.393; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 43414; R: 0.999989; R²: 0.999978; Weighting: None; Equation: $Y = 1,30e+003 X - 1,37e+002$; Normalized Intercept/Slope: -0.001945; RSD(E): 0.501683

Peak: Patulina

	Sample Name	Result Id	Peak Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	S1 - 8	43415	Patulina		8.000	10489.825	8.161	-1.97	No	No
2	S2 - 16	43416	Patulina		16.000	20825.500	16.099	-0.61	No	No
3	S3 - 25	43417	Patulina		25.000	32185.000	24.823	0.71	No	No
4	S4 - 50	43418	Patulina		50.000	64711.300	49.803	0.40	No	No
5	S5 - 100	43419	Patulina		100.000	130221.200	100.114	-0.11	No	No

Reported by User: Maria João Barreira (Mjbarreira)
 Report Method: LC Calibration Report
 Report Method ID 1015
 Page: 1 of 1

Project Name: Patulina
 Date Printed:
 5/13/2014
 1:57:35 PM Europe/Lisbon

Anexo III - Atividades Extras

- ✓ Participação em conferências e formações
 - ➔ Encontros com Ciência do DAN, entre 1 de Fevereiro de 2013 e 20 de Dezembro de 2013 no Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge em Lisboa.
 - ➔ CHROM FORUM da VWR: ‘‘Cromatografia e Segurança em Cromatografia’’; 1 de Outubro de 2013 na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
 - ➔ Waters Portugal: ‘‘Seminário sobre Troubleshooting em HPLC e HPLC®’’; 7 de Maio de 201 no Hotel Olisippo Oriente em Lisboa.
- ✓ Digestão de amostras para determinação de nitratos
- ✓ Auxílio na cultura de células Caco-2 para o estudo de transporte trans-membranar de micotoxinas
- ✓ Homogeneização e identificação de amostras no âmbito do projecto Micomix
- ✓ Elaboração de: índices, lista de abreviaturas, tradução tabelas e referências bibliográficas, para o livro: Alvito P.C. (2014). Alterações do estado de saúde associadas à alimentação, contaminação química- micotoxinas. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Portugal.